

Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT

FÜR INDUKTIVE ABSTAMMUNGS- UND

VERERBUNGSLEHRE

HERAUSGEGEBEN UND GELEITET

VON

CH. AUERBACH · H. BAUER · E. HADORN · A. KÜHN
G. MELCHERS · F. OEHLKERS · H. STUBBE

87. BAND 4. HEFT

MIT 47 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 8. AUGUST 1956)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

Z. Ver-
erbungslehre

Preis DM 33.80

Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre

Begründet 1908. Herausgegeben von C. Correns, V. Haecker, G. Steinmann, R. v. Wettstein, Erwin Baur u. a. Band 1—81 (1944) Berlin, Gebr. Bornträger, ab Band 82 (1948) Berlin, Springer.

Die „Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Manuskripte sind unter Berücksichtigung der besonderen Arbeitsrichtung an einen der nachstehenden Herausgeber zu senden:

Dr. Charlotte Auerbach, Institute of Animal Genetics, Kings Buildings, West Mains Road, Edinburgh/Schottland,

Professor Dr. Hans Bauer, Wilhelmshaven, Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Anton-Dohrn-Weg,

Professor Dr. Ernst Hadorn, Zürich (Schweiz), Zoologisches Institut der Universität, Künstlergasse 16,

Professor Dr. Alfred Kühn, Tübingen, Max-Planck-Institut für Biologie, Spemannstraße 34,

Professor Dr. Georg Melchers, Tübingen, Max-Planck-Institut für Biologie, Corrensstraße 41,

Professor Dr. Friedrich Oehlkers, Freiburg i. Br., Botanisches Institut, Schänzlestraße 9—11,

Professor Dr. Hans Stubbe, Gatersleben (Bezirk Halle), Institut für Kulturpflanzenforschung.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Bei den Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Von jeder Arbeit werden 75 Sonderabdrucke unentgeltlich geliefert.

Dissertationen und Habilitationsschriften werden als solche nicht in die Zeitschrift aufgenommen. Ist eine in die Zeitschrift aufgenommene Arbeit als Dissertation oder Habilitationsschrift von einer Fakultät angenommen, darf dies durch eine Fußnote vermerkt werden. Mit allen für eine Dissertations- oder Habilitationsschrift notwendigen Sonderausstattungen (besonderer Titel, Lebenslauf usw.) befaßt sich der Verlag grundsätzlich nicht, er stellt jedoch den Doktoranden bzw. Dozenten den Satz zur Verfügung zwecks Anfertigung der Dissertations- bzw. Habilitationsexemplare.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz für Originalabhandlungen und kleinere Mitteilungen von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen.

Alle Korrekturen sind an

Professor Dr. Georg Melchers, (14b) Tübingen, Max-Planck-Institut für Biologie, Corrensstraße 41,

alle die Zeitschrift betreffenden geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag, (17a) Heidelberg, Neuenheimer Landstraße 24,
zu senden.

Die geschäftsführenden Herausgeber:

*G. Melchers
H. Stubbe*

**Berlin W 35
Reichpietschufer 20
Fernsprecher: 24 92 51**

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Warenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität Köln

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BLATTENTWICKLUNG AN LACINIATEN UND ASPLENIFOLIATEN DIKOTYLEN GEHÖLZEN*

Von

HERMANN BERNHARD LÜCK

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Oktober 1955)

A. Einleitung

Um über die Entwicklungsphysiologie eines Pflanzenorgans Auskunft zu erhalten, stehen zwei Wege offen. Einmal kann man durch das entwicklungsmechanische Experiment die Entwicklung so verändern, daß es dem Beobachter möglich wird, abhängige Prozesse von unabhängigen zu unterscheiden. Eine zweite Möglichkeit ist, nach solchen Objekten zu suchen, bei denen die gewünschten Veränderungen von vornherein Bestandteil der Normogenese sind. Das ist vor allem bei unifaktoriellen Mutanten der Fall. Der Vorteil der zweiten Methode besteht darin, daß keine Schädigungen durch das Experiment gesetzt werden, sondern daß nur durch einen Vergleich mit den Normalformen Rückschlüsse auf die Physiologie der Entwicklung gewonnen werden können. Darüber hinaus sind solche Untersuchungen gleichzeitig Hinweise auf die Physiologie der Genwirkung. Bei biochemischen Untersuchungen hat sich diese Methode als sehr fruchtbar erwiesen. Dagegen ist bis heute die Kenntnis über die Zusammenhänge bei der Morphogenese höherer Pflanzen recht gering geblieben. Als einer der ersten hat in dieser Weise SINNOT (1927) und SINNOT und KAISER (1934) die Wirkung der Gene auf die Fruchtform von *Cucurbita* und *Capsicum* analysiert. An Blättern liegen genphysiologische Untersuchungen in nur sehr geringem Umfange vor. HAMMOND (1941 a, b) befaßt sich mit den Blättern von *Gossypium*, WHALLEY und WHALLEY (1942) mit solchen von *Tropaeolum*. Diese Untersuchungen beschränken sich aber mehr auf die äußeren Veränderungen der Blattform während der Entwicklung, die meist durch Messungen beschrieben werden. Für die vorliegende Arbeit gaben lacinierte und asplenifoliolate Formen verschiedener Laubgehölze das geeignete Material ab. So schreibt auch HEIDENHAIN (1932) bei der Besprechung laciniater Blätter: „... , daß der Übergang der Blätter in die lacinierte Form gewissermaßen eine von der Natur veranstaltete freiwillige Analyse der Blattstruktur ist, welches zudem sicherer ist als jedes entwicklungsmechanische Experiment...“.

Wenn auch die genetische Grundlage der untersuchten Blattabweichungen unbekannt bleiben muß, so darf wohl aus Analogiegründen angenommen werden, daß sie unifaktoriell bedingt sind; denn einmal treten solche Abweichungen als Knospenmutanten gelegentlich immer wieder an normalen Bäumen auf, zum anderen waren keine Chromosomen- und Genommutationen festzustellen. BÜNNING (1953, S. 22) beschreibt im Kapitel über die Genphysiologie lacinierte Bäume als unifaktorielle Mutanten.

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln.

B. Material, Methoden und statistische Auswertung

Als Material dienen die normalen und abweichenden Formen folgender Arten:

Name der Versuchspflanze	Standort	Höhe
<i>Rhamnus frangula</i> L.	Lichte Hecke	3—4 m
<i>Rhamnus frangula</i> L. f. <i>asplenifolia</i> DIPP.	Schattiger Ort	1,5 m
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Freie Rasenfläche	15—20 m
<i>Aesculus hippocastanum</i> L. f. <i>asplenifolia</i> HORT.	Freie Rasenfläche	3—4 m
<i>Betula pendula</i> ROTH. f. <i>youngi</i> C. SCHN.	Sonnige Allee	3—4 m
<i>Betula pendula</i> ROTH. f. <i>dalecarlica</i> C. SCHN.	Sonnige Allee	12—15 m
<i>Corylus avellana</i> L.	Lichte Hecke	5—6 m
<i>Corylus avellana</i> L. f. <i>laciniata</i> PETZ et KIRCH.	Lichte Hecke	5—6 m

Dem Direktor des Botanischen Gartens der Stadt Köln, Herrn Prof. Dr. J. STRAUB, sei auch an dieser Stelle für die Erlaubnis gedankt, in den Anlagen an den Bäumen Fixierungen und Messungen durchzuführen.

Während des ganzen Jahres wurden Knospen entweder für die Präparation unter dem Binokular unfixiert oder für die Herstellung von Paraffinschnitten fixiert verwendet. Als Fixierungsgemische bewährten sich sowohl ein Alkohol(95%)-Eisessiggemisch im Verhältnis 3:1 als auch das von CLELAND abgeänderte Fixiergemisch nach BOVIN (600 ml gesättigte Pikrinsäure, 40 ml Eisessig, 6 g Chromsäure vor dem Gebrauch mit 200 ml 40%-Formol und 9 g Laktose im Verhältnis 3:1 vereint). Aus dem fixierten Material wurden mit der üblichen Mikrotomtechnik unter Verwendung von Methylbenzoat Paraffinschnitte in der Dicke von 8—12 μ angefertigt. Die Färbung erfolgte in allen Fällen mit Kristallviolet von HOLBORN nach der von OEHLKERS (1940) beschriebenen Methode. Für die Herstellung von Epidermisaufsichtspräparaten wurde die von WHITTENBERGER und NAGHSKI (1948) angegebene Methode unter Verwendung von zellulosezersetzenden anaeroben Bakterien (*Clostridium roseum* MCCOY et MCCLUNG) verwandt, die von der American Type Culture Collection in Washington 6 DC, 2029 M Street, NW, bezogen wurden. Die isolierten Epidermen wurden 24 Std mit Karmin-Essigsäure nach LORBEER angefärbt und mit Glycerin-gelatine eingebettet. Die für die Präparate und Messungen benötigten Blätter stammen alle aus äußeren sonnenbeschienenen Teilen der Bäume. Schattenblätter wurden nicht verwandt.

Die statistische Beschreibung des Materials erfolgte durch Mittelwerte, Regressionskoeffizienten und deren einfache mittlere Fehler. Diese Maßzahlen wurden in der von MATHER (1951) angegebenen Weise berechnet. Mittelwerte und Regressionskoeffizienten verschiedener Messungsreihen wurden mit Hilfe des *t*-Testes verglichen. Varianzanalytisch wurden die Linearität der Regressionslinien (MATHER 1951) und ein Teil der Blattgrößmessungen getestet. Mit den *t*- und *F*-Werten wurde in das Tafelwerk von FISHER-YATES (1948) eingegangen und die zugehörigen *P*-Werte aufgesucht.

Mikroskope: Zeiss Standardmikroskop, Objektive: Neofluar 16-, 40-, 100fach, Okulare: Kompensationsokulare 8fach. Zeiss-Opton Stereomikroskop. Mikrophotographische Einrichtung von Leitz.

C. Untersuchung der Blattentwicklung

I. *Rhamnus frangula* L. und *Rhamnus frangula* L. *asplenifolia* DIPP.

a) Die Morphogenese der Blätter

1. *Rhamnus frangula*: Die Blätter entstehen in akropetaler Reihenfolge am Vegetationskegel. Die verschieden alten Blätter eines Vegetationskegels bieten die Möglichkeit, die einzelnen Stadien der Blattentwicklung gleichzeitig zu studieren. Die jüngsten Stadien finden sich an der Spitze, die älteren an den unteren Teilen eines Sprosses. Jedes Blatt wird zuerst als eine seitliche Hervorwölbung am Vegetationskegel sichtbar, die sich verbreitert, bis sie etwa $\frac{1}{8}$ des Vegetationskegels umgreift. Auf diese Periode des Breitenwachstums folgt ein bevorzugtes Längenwachstum. Das Primordium wird schlank kegelförmig und an der Spitze abgerundet. Seitlich an seiner Basis entstehen seine beiden Stipeln als

kleine, undifferenzierte Höcker. Die adaxiale Seite des Primordiums flacht sich ab, und die Mittellinie wird infolge der Hervorwölbung der Seiten als rinnenförmige Vertiefung zurückgelassen. Auf den beiden Seitenrändern der auf der Mittellinie verlaufenden Rinne wächst ein Randsaum aus, der vom übrigen Primordium scharf abgesetzt ist: die Spreitenanlage (Abb. 1a). Die größte Ausdehnung erreicht sie in der halben Länge des jungen Blattes, zur Basis und zur Spitze nimmt die Breite ab. An ihrer breitesten Stelle treten bald die ersten Seitennervenanlagen als geringe Erhöhungen an den Außenseiten auf. Dazwischen verbleiben flache Stellen, die am Rande auslaufen. Der Rand selbst ist durch einen verdickten Steg gebildet, in den die Seitennervenanlagen einmünden. Damit besteht das junge Blatt aus zwei deutlich voneinanderabgesetzten Teilen: dem alten Primordium, das zur Mittelrippe geworden ist, und dem aus dem Primordium herausgewachsenen beiden Anlagen der Spreitenhälften, die auf der adaxialen Seite entstehen und mit ihren späteren morphologischen Oberseiten einander zugewandt sind (Abb. 1b). Die Spreite nimmt langsam an Breite zu. Dabei setzt sich das zwischen den Seitennerven liegende Gewebe immer

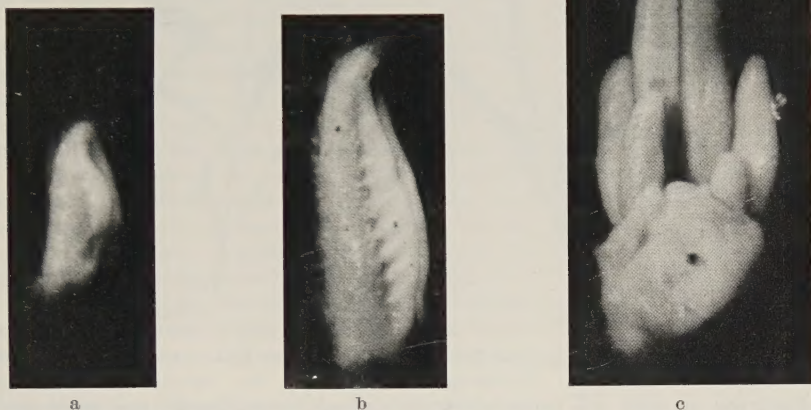


Abb. 1a—c. *Rhamnus*. Junge Blattprimordien von *fr.* (a und b) und Vegetationskegel mit Primordien von *aspl.* (c). Länge der Blättchen: a 0,5 mm, b 0,95 mm und c größtes Primordium 1,1 mm

mehr von den Seitennerven selbst ab, die ihrerseits dicker werden. Im folgenden sollen die zwischen den Seitennerven liegenden Laminat Teile in Anlehnung an die anglikanische Literatur als Mesophyll bezeichnet werden. Daneben werden aber auch die zwischen den beiden Epidermen der Lamina liegenden und nicht zum Leitgewebe gehörenden Zellschichten Mesophyll genannt werden. Aus dem Zusammenhang wird jeweils hervorgehen, welche der beiden Bedeutungen gemeint ist. Gleichzeitig mit den geschilderten Wachstumsvorgängen in der Querrichtung verlängert sich das Blatt. Dieses Längenwachstum ist auf eine Zone beschränkt, die von der Spitzenregion ausgehend wellenförmig über die ganze Längsachse des Blattes fortschreitet. Erreicht das Wachstum die Blattbasis, so wird zwischen den Spreitenteil und die Insertionsstelle des Blattes am Sproß der Stiel eingeschoben. Die adaxiale Seite des Stieles ist wie die des Primordiums vor Anlage der Spreite in der Mittellinie rinnenförmig eingezogen, aber diese Rinne ist flacher und weniger ausgeprägt. An der Übergangsstelle in den Sproß verschwindet sie ganz. Wenn das Blatt ungefähr 2 cm lang geworden ist, beginnt meist im proximalen Spreitenteil die Entfaltung der hochgeklappten Spreitenhälften, die in diesem Entwicklungsstadium etwa 3—6 cm breit sind. Danach wächst das Blatt weiter in die Breite und in die Länge. Das mit den Seitennerven zusammen die Spreite bildende Mesophyll wird vermehrt, und in ihm bildet sich das feinere und feinste Nervenetz aus.

2. *Rhamnus frangula asplenifolia*. Da es bei den vorliegenden Untersuchungen auf einen Vergleich der Entwicklungsabläufe von *Rhamnus frangula* (*fr.*) und *Rhamnus frangula asplenifolia* (*aspl.*) ankommt, wird bei *aspl.* nur auf ein unterschiedliches Verhalten während der Morphogenese einzugehen sein. Bei beiden Formen gleichen sich die ersten Entwicklungsstadien. Es wird aber, obwohl das Blatt in der Länge wächst, außer einem bei 25facher

Vergrößerung kaum sichtbaren, sehr schmalen und flachen Saum an den Seitenrändern der schärfer als bei *fr.* eingezogenen Mittelrinne keine sich weiter differenzierende Spreitenanlage ausgebildet (Abb. 1c). In diesem Entwicklungsstadium läßt sich klar zwischen einem „Spreiten“teil und dem Stiel unterscheiden. Der Spreitenteil ist gekennzeichnet durch die schmale Mittelrinne und durch den kleinen Saum auf ihren seitlichen Rändern, der Stiel durch das Fehlen dieses Saumes und durch die Verflachung der Mittelrinne.

Wenn das Blatt zu einer Länge von 4–6 cm herangewachsen ist, tritt nun doch eine randsaumähnliche Bildung hervor. Sie wächst in der Spreitenregion zu einer am fertig ausgebildeten Blatt 1–2 cm breiten Spreite aus. Im Gegensatz zu *fr.* ist sie nicht eiförmig sondern schmal und zugespitzt. Die Nervatur ist schwächer ausgebildet. Die Spreite wird von vielen kleinen Seitennerven versorgt, die meist direkt in die Mittelrippe einmünden.



Abb. 2. *Rhamnus frangula asplenifolia*. Normaler Endtrieb (links) und Wasserreis (rechts)

Der Blattrand ist nicht wie bei *fr.* glatt sondern sehr unregelmäßig und leicht gekräuselt. Zwischen den Blättern normaler Endtriebe und denen der Wasserreiser besteht ein Unterschied. Bei den letzteren verbreitert sich die Spreite im proximalen Drittel etwas stärker als in den anderen Teilen des Blattes. Auch sonst sind sie etwas breiter (Abb. 2).

b) Das Längenwachstum und die Größe ausgewachsener Blätter

Im Frühjahr 1954 wurde an je vier markierten Knospen von *fr.* und *aspl.* während der Monate April bis Juni die Länge der Blätter gemessen. Die Stellung am Vegetationskegel wurde dabei berücksichtigt. Das älteste Blatt ist im folgenden als Blatt Nr. 1 bezeichnet, die nächst jüngeren werden als Blatt Nr. 2, 3 usw. beschrieben werden. Es war zu vermuten, daß das Längenwachstum der Blätter zumindest in bestimmten Entwicklungsstadien der allometrischen Wachstumsfunktion

$$y = y_0 e^{kx} \quad (\text{HUXLEY 1932})$$

folgen würde. Dabei bedeutet in diesem Falle y die Länge eines Blattes zu der Zeit x , y_0 die Blattlänge zur Zeit $x = 0$ und k das konstante Verhältnis der Blattlängenzunahme zum entsprechenden Zeitraum. Diese Formel ist durch eine logarithmische Transformation in die allgemeine Form einer linearen Funktion $y = a + b x$ umzuwandeln:

$$\log y = \log y_0 + k \cdot \log e \cdot x.$$

Dabei entspricht $b = k \cdot \log e$ und wird bei Anwendung dekadischer Logarithmen zu $b = k \cdot 0,4343$. Dieses b ist der Tangens des Steigungswinkel der Linearen, in einem Zeit-Längensystem also die Geschwindigkeit. Die Analyse des Längenwachstums der Blätter zeigte, daß sich in einem mittleren Bereich die Wachstumskurven der Blätter nach einer logarithmischen Transformation der Blattlängen (mit Hilfe dekadischer Logarithmen) signifikant als lineare Funktionen darstellen ließen. Die Berechnungen erfolgten durch lineare

Regressionsrechnung, die Prüfung der Linearität durch Varianzanalyse (MATHER 1951, S. 129). Die Regressionskoeffizienten wurden in der Form b berechnet, auf eine Umrechnung auf den Ausdruck k konnte verzichtet werden, da im folgenden nur die Regressionskoeffizienten als Ausdruck der Wachstumsgeschwindigkeit miteinander verglichen werden, wobei deren absolute Werte aber keine Rolle spielen.

1. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Blätter. In der Tabelle 1 ist die Geschwindigkeit des Längenwachstums, deren mittlerer Fehler und die Anzahl der Messungen für die ersten vier Blätter angegeben. Die Wachstumsgeschwindigkeit steigt sowohl bei *fr.* als auch bei *aspl.* vom ersten bis zum vierten Blatt an. Um diesen Anstieg statistisch zu sichern, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit jedes Blattes mit der des nächsten und übernächsten mit Hilfe des t -Testes (MATHER 1951, S. 119) geprüft. Bei *fr.* ergab diese Prüfung, daß die Unterschiede zwischen einander benachbarten Blättern nicht signifikant sind. Erst zwischen nicht unmittelbar benachbarten lassen sich die Differenzen zwischen den Geschwindigkeiten sichern. So ergibt sich zwischen Blatt 1 und 3 ein $t_{(30)} = 4,4$ ($P < 0,001$) und zwischen Blatt 2 und 4 $t_{(30)} = 3,1$ ($P = 0,01-0,001$). Das bedeutet, daß bei *fr.* die Wachstumsgeschwindigkeit der Blätter langsam vom ersten bis zum vierten Blatt ansteigt. Bei *aspl.* liegen die Verhältnisse ganz ähnlich. Es sind aber in allen Fällen schon die Unterschiede zwischen benachbarten Blättern gesichert. Außerdem wurden zwischen *fr.* und *aspl.* die Wachstumsgeschwindigkeiten von Blättern gleicher Stellung verglichen. Im Gegensatz zu den Blättern 3 und 4 zeigen die ersten beiden Blätter zwischen beiden Formen keine gesicherten Differenzen. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Blätter von *aspl.* ist also gegenüber *fr.* nicht von vornherein vergrößert, sondern sie nimmt erst im Laufe der Entwicklung in der Blattfolge zu. So ist auch der Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit beim zweiten Blatt schon so groß, daß der zugehörige P -Wert $P = 0,05$ bis $0,02$ an der Grenze der statistischen Sicherheit liegt.

Die Untersuchung zeigt, daß sowohl bei *fr.* als auch bei *aspl.* in der Blattfolge die Wachstumsgeschwindigkeit der Blätter größer wird, und daß diese Zunahme bei *aspl.* schneller erfolgt als bei *fr.* Die Wachstumsgeschwindigkeit des ersten Blattes ist bei beiden Formen nicht unterschieden.

2. Die Größe ausgewachsener Blätter. Die Länge ausgewachsener Blätter eines Triebes schwankt sehr stark. Die ältesten Blätter sind kleiner als die folgenden, und die jüngsten nehmen im Vergleich mit den letzteren an Größe wieder ab. Weiter zeigen die Urlisten, daß innerhalb der Blattfolge die Blattlänge nicht gleichmäßig an- und absteigt, sondern daß immer zwei benachbarte Blätter eine Gruppe bilden, in der ein Blatt relativ klein und eines relativ groß ist. Deshalb wurden bei den Berechnungen immer zwei Blätter zu einer Gruppe zusammengefaßt. Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Paaren von *fr.* ergibt, daß von den Blättern 1/2 bis zu den Blättern 7/8 ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Blattlänge auftritt,

Tabelle 1. Die Geschwindigkeit des Längenwachstums der Blätter von *Rhamnus frangula* und *Rh. fr. asplenifolia*

Blatt Nr.	<i>Rhamnus frangula</i>					<i>Rhamnus frangula asplenifolia</i>					Vergleich zwischen <i>fr.</i> und <i>aspl.</i>	
	Regressions- koeffizient b	mittlerer Fehler	Zahl der Mes- sungen	t	P	Regressions- koeffizient b	mittlerer Fehler	Zahl der Mes- sungen	t	P	t	P
1	0,0116	0,00112	15)	1,9	0,10-0,05	0,0110	0,00141	20)	3,8	< 0,001	0,3	0,80-0,70
2	0,0146	0,00119	20)	2,4	0,05-0,01	0,0193	0,00169	16)	4,6	< 0,001	2,3	0,05-0,02
3	0,0186	0,00118	19)	1,5	0,20-0,10	0,0303	0,00166	16)	2,9	0,01-0,001	5,7	< 0,001
4	0,0223	0,00215	14)			0,0431	0,00414	9)			4,5	< 0,001

und zwar von durchschnittlich 48 auf 85 mm (Abb. 3). Die Mittelwerte der folgenden Blattpaare bleiben in dem untersuchten Bereich bei Berücksichtigung ihrer Streuung konstant. Dieser Befund wird durch einen negativen Ausfall des Testes auf Unterschiede zwischen den Blättern 7/8 und 11/12, die durchschnittlich $85 \pm 2,9$ bzw. $77 \pm 4,7$ mm lang sind, bestätigt ($t_{(42)} = 1,4$, $P = 0,20-0,10$). Die Blattlängen von *aspl.* steigen von den Blättern 1/2 (57 mm) bis zu den Blättern 3/4 (82 mm) statistisch gesichert an. Die Werte der Blätter 3/4 und 5/6 geben mit 82 bzw. 81 mm die maximale Länge wieder, die von den folgenden Blattgruppen gesichert nicht mehr erreicht wird. Es wurde geprüft, ob die

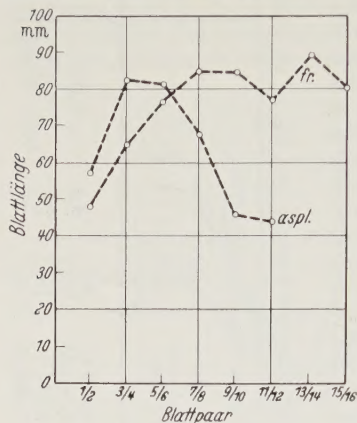


Abb. 3. Die Länge ausgewachsener Blätter von *Rhamnus frangula* und *Rh. frangula asplenifolia*

parallel läuft, konnten Querschnitte durch junge Primordien an Präparaten von Querschnitten durch Knospen untersucht werden.

1. *Rhamnus frangula*. Ein Querschnitt durch ein ganz junges Primordium ist rund und besteht nur aus meristematischem Gewebe. Das Protoderm ist als einheitliche Schicht klar

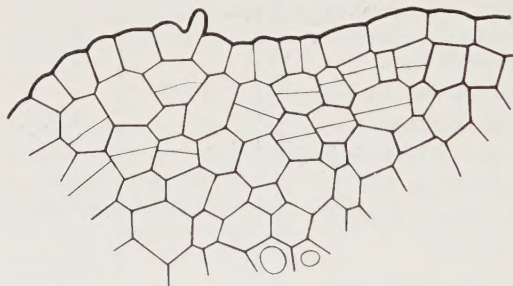


Abb. 4. *Rhamnus frangula*. Querschnitt durch ein meristematisches Primordium

axialen Seite verlagerte Procambium und ein peripher an der adaxialen Seite gelegenes Meristem, das adaxiale Meristem (Abb. 4). Die übrigen Zellen des Querschnittes beginnen sich zu vergrößern und werden zur parenchymatösen Cortex der späteren Blattmittlerippe. Das adaxiale Meristem ist durch antikline Teilungen des Protoderms und durch Periklinalteilungen in der ersten und zweiten subprotodermalen Schicht gekennzeichnet. Vor allem die Periklinalteilungen erfolgen in den seitlichen Teilen des Meristems häufiger als in der mittleren Region. Dadurch wird der anfänglich runde Primordienquerschnitt verändert (Abb. 5a). An den beiden Seiten treten kleine Hervorwölbungen auf, die aus dem Protoderm, dem Subprotoderm und einer mittleren Zelle bestehen. Die letztere ist als innere Tochter-

Längenunterschiede der Blattpaare mit den höchsten Mittelwerten, das ist bei *fr.* das Paar 7/8 mit $85 \pm 2,9$ mm und bei *aspl.* das Paar 3/4 mit $82 \pm 2,7$ mm, sich gegeneinander sichern lassen. Ein P -Wert von $0,50-0,40$ ($t_{(60)} = 0,8$) läßt die Entscheidung offen. Dagegen sind die Verschiebungen der Blattlängen innerhalb der Blattfolge bei beiden Formen signifikant. Das bedeutet gleichzeitig, daß der Anstieg vom Blattpaar 1/2 auf die maximale Länge bei *aspl.* schneller als bei *fr.* erfolgt. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Formen besteht darin, daß bei *aspl.* in der Blattfolge nach Erreichung der maximalen Länge schon bei den nächsten Blättern ein Abfall in der Blattlänge auftritt, im Gegensatz zu *fr.*, wo ein Abstieg gleich nach Erreichung des Maximums unwahrscheinlich ist.

c) Die Histogenese der Blätter

α. Das meristematische Blatt. Da die Längsachse eines jungen Primordiums im Stadium der Spreitenanlegung mit dem der Knospe

zu erkennen, aber schon die nächste Zellage, die Subprotodermis, ist nicht mehr durchgehend einheitlich. Im Innern des Primordiums liegen die Zellen unregelmäßig. Teilungen führen zu einer Erstarkung des jungen Blattes. Sie sind im Protoderm antiklin, im Subprotoderm antiklin und periklin und im Innern unregelmäßig orientiert. Nach der primären Erstarkungsperiode klingen die Teilungen im abaxialen Teil des Querschnittes ab, und schließlich bleiben nur zwei meristematische Zonen zurück: das im Innern etwas zur ad-

zelle aus einer subprotodermalen Zelle nach einer Periklinalteilung hervorgegangen. Die Mutterzelle wird als submarginale Initiale bezeichnet. Damit ist der Aufbau der meristematischen Spreite gegeben. Sie besteht aus dem adaxialen Protoderm, dem adaxialen Subprotoderm, der Mittelschicht, die durch periklinale Teilung aus der mittleren Zelle hervorgeht, dem abaxialen Subprotoderm und dem abaxialen Protoderm. Dieser Fünfschichtenbau (Abb. 5b) wird während der weiteren Spreitenentwicklung beibehalten. Damit ist die anfänglich einheitliche Spreitenanlage in zwei ineinander übergehende Teile zerfallen: in das marginale Meristem mit den marginalen Initialen im Protoderm und der submarginalen Initiale im Subprotoderm und in ein fünfschichtiges Meristem, das aus dem marginalen Meristem Zuwachs erhält und sich selbst durch Teilungen unter Beibehaltung des Fünf-

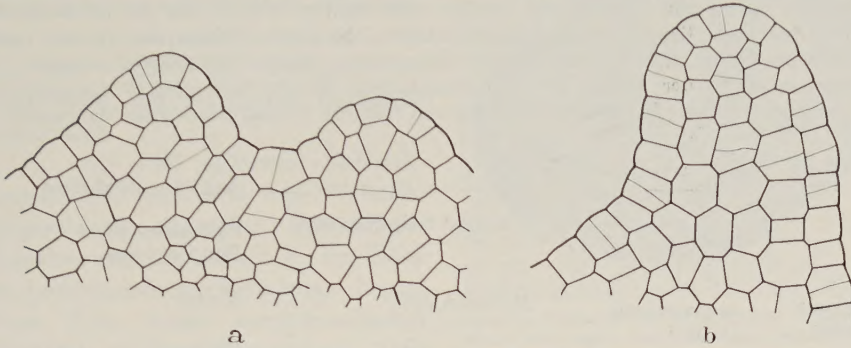
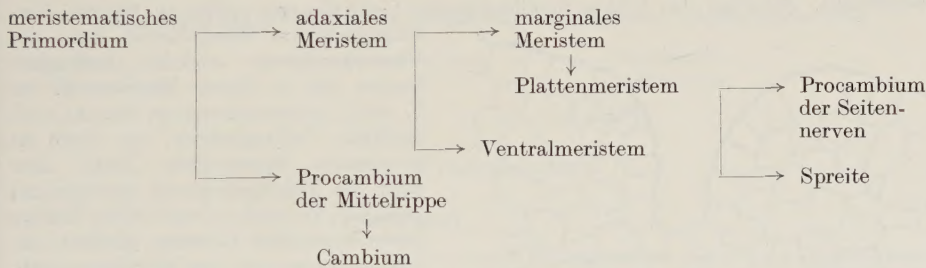


Abb. 5a u. b. *Rhamnus frangula*. Querschnitte durch eine Spreitenanlage (a) und das Plattenmeristem (b)

schichtenbaues vermehrt. Dieses Meristem wird als Plattenmeristem bezeichnet (SCHÜEPF 1926). Schematisch kann die Auseinanderentwicklung der Meristeme in der folgenden Art dargestellt werden:

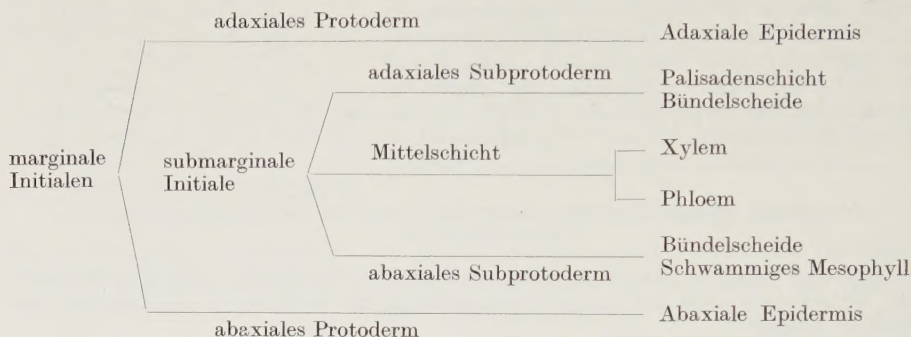
Die Ableitung der Meristeme des Blattes von *Rhamnus frangula*



Das marginale Meristem besteht aus den protodermalen und subprotodermalen Initialen. Die protodermalen Initialen teilen sich streng antiklin. Andere Teilungsrichtungen treten nicht auf. Es ist keine besonders ausgezeichnete Zelle zu erkennen, die als Initiale anzusprechen wäre. Die subprotodermale Initiale dagegen ist die der Margina nächstgelegene Zelle der Subprotodermis. Sie kann sich in zwei verschiedene Richtungen teilen: Antikline Teilungen vermehren die abaxialen und adaxialen Zellreihen, deren Abkömmlinge sich in die beiden subprotodermalen Schichten des Plattenmeristems eingliedern, während bei perikliner Teilung die innere Tochterzelle zur ersten Zelle der Mittelschicht des Plattenmeristems wird. Der Wechsel zwischen antiklinen und periklinen Teilungen ist so abgestimmt, daß keine Störungen im fünfschichtigen Aufbau der meristematischen Spreite auftreten. Das Plattenmeristem erhält also von der Margina Zuwachs. Der größte Zuwachs tritt wahrscheinlich aber im Meristem selbst auf.

Bei der Anlegung der Spreitenervatur wird die allgemeine Teilungsrichtung im Plattenmeristem durchbrochen. Eine oder auch zwei Zellen der Mittelschicht teilen sich periklin.

Die abaxiale Subprotodermis folgt mit Teilungen in der gleichen Richtung. Darauf teilen sich die entstandenen Tochterzellen wieder antiklin. Die folgenden Teilungsschritte erschweren die Übersicht. Durch sie werden Protoxylem und Protophloem angelegt. Zu einem späteren Entwicklungsstadium wird dann auch die adaxiale Subprotodermis in das Teilungsgeschehen durch Periklinalteilungen einbezogen. Die Seitennervenanlage macht sich durch eine Hervorwölbung auf der abaxialen Seite der Spreite bemerkbar. Das eigentliche Leitgewebe stammt also aus der Mittelschicht und wohl auch aus der abaxialen Subprotodermis, die Bündelscheide aus den adaxialen und abaxialen Subprotodermen. Die Seitennerven werden in der jungen Lamina in regelmäßigen Abständen voneinander angelegt. Die jüngsten Anlagen finden sich im Plattenmeristem in der Nähe des marginalen Meristems. Schon ein Abkömmling zweiten oder dritten Grades von der submarginalen Initialen kann die Seitennervenanlage einleiten. In älteren Teilen der Spreite werden im Plattenmeristem zwischen den großen Seitennerven kleinere Leitbündel angelegt. Zusammenfassend ist der Aufbau der meristematischen Spreite noch einmal schematisch in der von FOSTER (1936) für die Beschreibung von Blättern eingeführten Weise dargestellt:



Das adaxiale Meristem des Primordiums hatte an seinen Seiten die Spreitenmeristeme hervorgebracht. Zwischen den beiden Spreitenanlagen bleibt die erst später zu regerem Teilungswachstum übergehende Zone des Ventralmeristems zurück. Anfänglich fanden sich in diesem Meristem in der 1. und 2. subprotodermalen Schicht noch antikline Teilungswände, vor allem im proximalen Spreitenteil. Dann aber wird die Teilungsrichtung durchgehend periklin. Es wird so eine dicke Zellige parenchymatösen Gewebes gebildet, um das das Leitgewebe der Mittelrippe halbmondförmig herumgelagert ist.

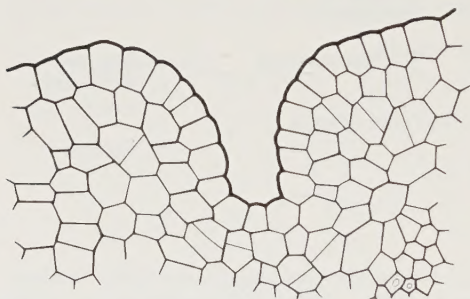


Abb. 6. *Rhamnus fr. asplenifolia*. Querschnitt durch ein Primordium. Antikline Teilungen in der 1. und 2. subprotodermalen Schicht

2. *Rhamnus frangula asplenifolia*.

Die Querschnitte durch die ersten Entwicklungsstadien der Primordien bieten die gleichen Bilder wie *fr.*

Ebenso wie dort bleiben schließlich ein adaxiales Meristem und das Procambium als meristematische Zonen zurück. Der wesentliche Unterschied zur Normalform ist bei der Betrachtung der Teilungstätigkeit des adaxialen Meristems zu finden. Zwar führen die Teilungen protodermaler und subprotodermaler Zellen zu einer geringen Hervorwölbung der adaxialen Primordienenseite (Abb. 6), aber im eigentlichen Subprotoderm werden keine submarginalen Initialen ausgebildet. Es sind nur einige wenige antikline Teilungen zu finden. Bei *fr.* bilden die unter

der Subprotodermis liegenden Zellen durch perikline Teilungen den Anschluß der auswachsenden Lamina an den Aehsenkörper. Diese Teilungen finden bei *aspl.* auch statt, es teilt sich aber die Zelle unterhalb der Subprotodermis nicht weiter periklin, sondern bildet nur ein- oder zweimal antikline Teilungswände aus. Danach stagniert die meristematische Aktivität an den Seiten des adaxialen Meristems.

Als erste bemerkbare Ursache für die anfänglich ausbleibende Entwicklung der Blattspreiten von *aspl.* ist also der Verlust der Fähigkeit zu verzeichnen, ein marginales Meristem auszubilden.

In sehr viel späteren Entwicklungsstadien setzt eine rege Teilungstätigkeit in adaxialen Parenchymschichten ein, die seitlich in der Nähe des Leitbündels der Mittelrippe liegen.

Diese Zone neuer meristematischer Aktivität greift auf periphere Teile über, und es wächst aus dem Bereich der Mittelrippe ein anfänglich über 10 Zellen dickes Gebilde aus, das einer Spreitenanlage ähnlich sieht (Abb. 7). Es soll als „Ersatz“spreitenanlage bezeichnet werden. So stellt sich bei *aspl.* die Entwicklung der auseinander entstehenden Meristeme wie folgt dar:

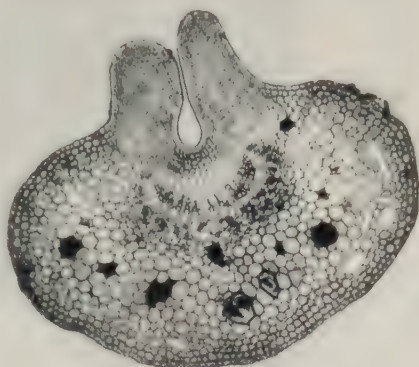
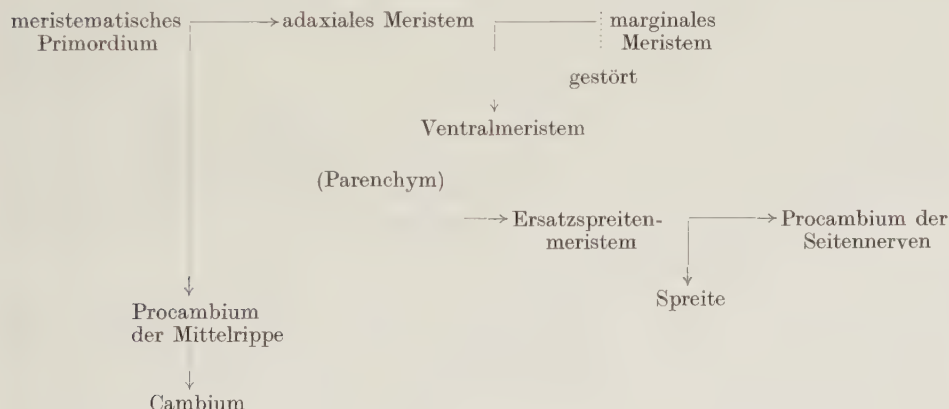


Abb. 7. *Rhamnus fr. asplenifolia*. Querschnitt durch ein junges Blatt mit sich entwickelnden Ersatzspreitenanlagen

Die Ableitung der Meristeme des Blattes von *Rhamnus frangula asplenifolia*



Die Zellen der Ersatzspreite weisen dichte Plasmastrukturen auf und färben sich mit Kristallviolett stark an. Hinter dem keulig verdickten Rand dieses Meristems, dessen Zellen bis auf die Protodermis einen ungeordneten Haufen bilden, kommt es zu einer plattenmeristem-ähnlichen Gliederung in Zellschichten, deren Zahl zwischen sieben und acht schwankt. Als besonders auffällig erscheint der scharfe Übergang vom Ventralmeristem zum Ersatzspreitenmeristem (Abb. 8). Aus den Zellen differenzieren sich Gewebeelemente aus, die denen der Spreite von *fr.* gleichen. Die unter dem adaxialen Protoderm liegenden Zellen bilden

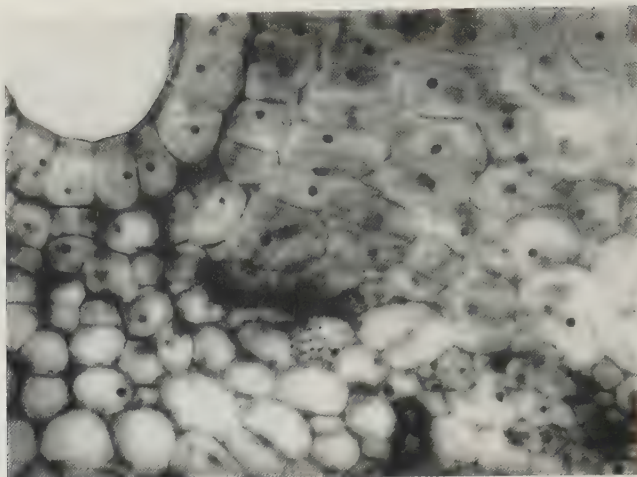
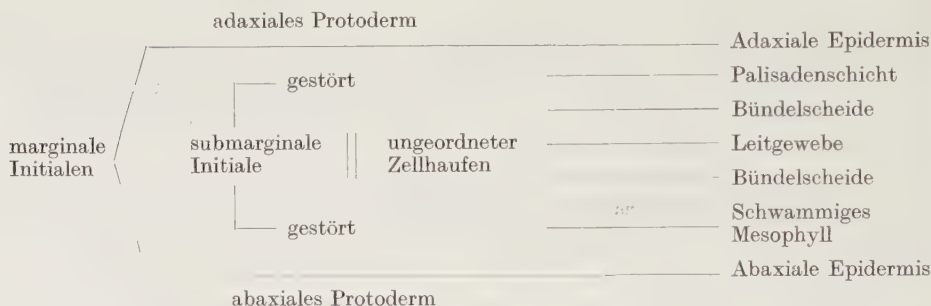


Abb. 8. *Rhamnus fr. asplenifolia*. Zellen des Ventralmeristems (links oben) und des Ersatzspreitenmeristems (rechts oben)

sich unter Längsstreckung zu Palisadenzellen um, die übrigen Zellen des Innern werden zum schwammigen Mesophyll. Dies ist in dem folgenden Schema dargestellt:



Die Ausbildung der Spreite von *aspl.* erfolgt also über ein „Ersatz“spreitenmeristem, das primär weder aus einem Marginal- noch aus einem Plattenmeristem aufgebaut ist, sondern das erst im Verlauf der Entwicklung eine zunehmende Organisierung zu einem plattenmeristemähnlichen Aufbau erlangt. Seine Zellen setzen sich scharf von denen der Mittelrippe ab.

3. *Die Leitbündelentwicklung.* In der Ausbildung des Leitgewebes der Mittelrippe und des Blattstiemes bestehen zwischen den beiden Formen Unterschiede. Bei *fr.* werden im Holzteil mehr Zellreihen angelegt als bei *aspl.* An Querschnitten durch das älteste Blatt einer Anzahl Anfang April 1953 gleichzeitig fixierter Knospen wurde die Zahl der Xylemreihen in der Übergangsregion von der Spreite zum Blattstiel ausgezählt. Einer durchschnittlichen Reihenzahl von $25,3 \pm 0,94$ bei *fr.* stehen bei *aspl.* $15,6 \pm 0,15$ gegenüber. Der Unterschied ist mit einem *P*-Wert von $P < 0,001$ ($t_{(19)} = 10,2$) statistisch gut gesichert (Abb. 9, Blatt Nr. 1). Die Xylemparenchymzellen werden bei *aspl.* größer als bei *fr.* und erreichen den Durchmesser der Xylemzellen. Bei *fr.* bleibt ihr Durchmesser auf etwa $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{3}$ der Xylemzellen beschränkt.

Weiter war von Interesse, ob die Zunahme der Reihenzahl mit zunehmender Blattgröße bei beiden Formen relativ gleich ist. Zu diesem Zwecke wurden nicht nur die ältesten Blätter der Knospenquerschnitte sondern auch die jüngeren in die Untersuchungen einbezogen.

Das Ergebnis ist in Abb. 9 dargestellt. Da wahrscheinlich die Zunahme der Reihen mit dem Längenwachstum der Blätter parallel läuft, wurden die Reihenzahlen nach logarithmischer Transformation ausgewertet. Der Vergleich der Regressionskoeffizienten zeigt, daß kein Unterschied in den Steigungswinkeln zu sichern ist, d. h. daß mit zunehmender Länge der Blätter wohl die Anlegung neuer Reihen bei beiden Formen mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt ($b_{fr.} = -0,182 \pm 0,0144$, $b_{aspl.} = -0,199 \pm 0,0200$, $t_{(110)} = 0,7$, $P = 0,50 - 0,40$). Ein weiterer Unterschied in der Ausbildung des Holzgewebes besteht zwischen beiden Formen in der Anzahl der Xylemzellen, die eine Reihe aufbauen. Bei *fr.* sind es maximal 5 Zellen, bei *aspl.* meist 6.

Diese Befunde zeigen, daß sich in den Blättern von *aspl.* das Leitgewebe durch eine unterschiedliche Ausbildung des Holzteiles von dem der Normalform unterscheidet. Dies drückt sich in einer Verminderung der Reihen von Xylemzellen, in der Vermehrung der Anzahl der Zellen, die eine Reihe aufbauen, und in der Vergrößerung der Xylemparenchymzellen aus. Dagegen ist die Zunahme der Zahl der Xylemreihen im Laufe der Entwicklung zwischen beiden Formen relativ nicht unterschieden.

β) *Das ausgebildete Blatt.* Die Spreite von *aspl.* ist zwar weit schmaler als die von *fr.* und unterscheidet sich von der Normalform durch eine Reihe von Merkmalen, ihr histologischer Aufbau gleicht aber auf der anderen Seite den Blättern von *fr.* weitgehend. Es soll untersucht werden, ob trotz des gleichen Bauprinzipis zwischen den beiden Formen wesentliche Unterschiede auftreten. So wurden die Blattdicke, die durchschnittlichen Zellengrößen, der Anteil der einzelnen histologischen Elemente am Aufbau der Lamina und die Dichte der Spaltöffnungen auf der Blattober- und -unterseite untersucht.

Die Blattdicke wurde 0,5 bis 1 cm von der Mittelrippe entfernt im mittleren Spreiten-teil an unfixierten Handschnitten gemessen. Dabei erwies sich die Lamina von *fr.* mit einer durchschnittlichen Dicke von $0,104 \pm 0,0039$ mm gegenüber *aspl.* mit der Dicke $0,161 \pm 0,0027$ mm bei einem P -Wert $< 0,001$ ($t_{(21)} = 12,2$) in statistisch gesichertem Maße als dünner. Worauf beruht diese Erhöhung der Blattdicke bei *aspl.*? Die obere wie die untere Epidermis sowie das Palisadenparenchym bestehen bei beiden Formen aus einschichtigen Zellagen. Das schwammige Mesophyll setzt sich dagegen bei *fr.* aus 4—5 und bei *aspl.* aus 5—6 Zellschichten zusammen. Die Länge der Palisadenzellen der Normalform ($0,031 \pm 0,0009$ mm) ist geringer als die von *aspl.* ($0,045 \pm 0,0015$ mm). Ein P -Wert $< 0,001$ ($t_{(21)} = 8,0$) bestätigt diesen Befund. Weitere Größenveränderungen bei den übrigen Zellen des Blattquerschnittes konnten nicht festgestellt werden. Für die Vergrößerung der Blattdicke bei *aspl.* ist also neben der Vermehrung der Schichtenzahl des Mesophylls eine Verlängerung der Palisadenzellen verantwortlich. Die Fläche der Epidermiszellen auf der Blattober- und -unterseite wurde in Aufsichtspräparaten durch Auszählen der Zellenzahl je Einheit des Netzkulares und Umrechnung auf die durchschnittliche Fläche einer Epidermiszelle bestimmt, die Länge der Epidermiszellen in ganz entsprechender Weise durch Zählung der Zellenzahl je Längeneinheit des Okularmikrometers und Umrechnung auf die durchschnittliche Länge einer Epidermiszelle. Sowohl auf der Blattober- als auch auf der -unterseite bestanden zwischen *fr.* und *aspl.* gut gesicherte Unterschiede in der durchschnittlichen

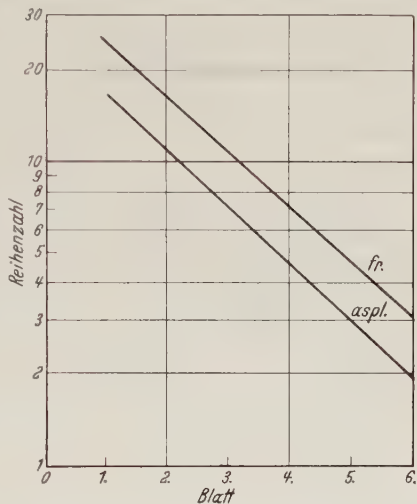


Abb. 9. Die Zunahme der Xylemreihen mit zunehmendem Alter der Blätter bei *Rhamnus frangula* und *Rhamnus fr. asplenifolia*

Tabelle 2. Größe der Epidermiszellen bei *Rhamnus frangula* und *Rh. fr. asplenifolia*

	<i>Rhamnus frangula</i>			<i>Rhamnus frangula asplenifolia</i>			Vergleich zwischen <i>fr.</i> und <i>aspl.</i>	
	durchschnittliche Fläche einer Epidermiszelle in mm ²	mittlerer Fehler	Zahl der Messungen	durchschnittliche Fläche einer Epidermiszelle in mm ²	mittlerer Fehler	Zahl der Messungen	t	P
Blattoberseite	0,000643	0,0000152	24	0,000748	0,0000292	36	3,1	0,01—0,001
Blattunterseite	0,000726	0,0000556	24	0,000880	0,0000229	24	2,7	0,01—0,001

Fläche einer Epidermiszelle. In beiden Fällen erwiesen sich die Zellen von *aspl.* als größer (Tabelle 2). Spaltöffnungen wurden nur auf der Blattunterseite gefunden. Bei *fr.* beträgt ihre Zahl je mm² fast das Doppelte von *aspl.* Das Verhältnis von $410 \pm 18,3$ zu $216 \pm 11,6$ Spaltöffnungen je mm² ist mit $P < 0,001$ ($t_{(42)} = 9,0$) gut gesichert.

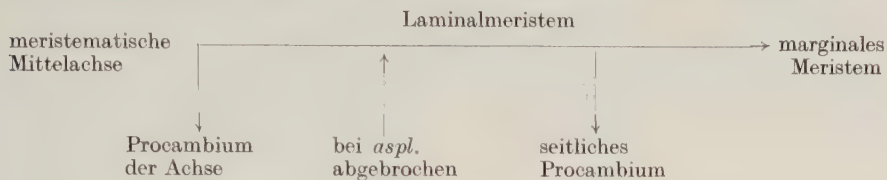
d) Die Blütenblätter

Nachdem in den Blättern von *aspl.* Störungen der meristematischen Tätigkeit festgestellt worden waren, lag es nahe, ähnliche Erscheinungen in blatt-homologen Organen zu suchen. Aus diesem Grunde wurden die Blüten untersucht. Die Kelch-, Staub- und Fruchtblätter weisen keine morphologischen und anatomischen Unterschiede zwischen beiden Formen auf, wohl aber die Blütenblätter, die bei *fr.* die obdiplostemon stehenden Staubblätter mit breiten, sehr zarten Flügelrändern umfassen. Im Gegensatz dazu findet man bei *aspl.* nur schmale, schwach geflügelte Petalen. Die Anatomie der Blütenblätter wurde an Querschnitten untersucht.

1. *Rhamnus frangula*. Ein junges Blütenblatt besteht aus einem parenchymatösen Mittelteil mit einem Leitbündel, einer undifferenzierten Epidermis und meristematischen, sich verjüngenden Flanken. In diesen laufen antikline und perikline Teilungen ab. In den Flanken kann es zur Anlage von je einem weiteren Leitbündel kommen. Diese münden dann in basalen Teilen des Blütenblattes in den Mittelstrang. Die Verjüngung der Blütenblatttränder beruht auf einer Verminderung der an ihrem Aufbau beteiligten Zellschichten. Die Protodermis ist in diesem Bereich noch nicht zur Epidermis ausdifferenziert und teilt sich streng antiklin. In der Subprotodermis treten neben antiklinen besonders perikline Teilungen auf. In der Nähe der Margina wird die Zahl der Zellschichten immer geringer, und endlich verbleiben nur noch drei Schichten. Im weiteren Wachstumsverlauf teilt sich die marginale Zelle der Mittelschicht antiklin, ebenso wie deren innere Abkömmlinge. Die Protodermis folgt mit gleichgerichteten Teilungen. Der Übergang vom dreischichtigen zum mehrschichtigen Teil ist kontinuierlich und wird durch Periklinalteilungen gegeben. Damit hat sich das anfänglich einheitliche Ausgangsmeristem in zwei Zonen aufgeteilt. Das marginale Meristem, dessen Zellen sich antiklin teilen, besteht aus einem subprotodermalen und ein bis zwei protodermalen Initialen, das laminare mit vorwiegend perikliner Teilungsrichtung ist die direkte Fortsetzung des Ausgangsmeristems und stellt seine Teilungstätigkeit nach kurzer Zeit ein. Bald nach der Anlegung des Marginalmeristems gehen die nicht betroffenen Zellen in die Periode der Zellstreckung über, und weitere Teilungen unterbleiben in diesen Bereichen. Die vergrößerten Zellen der Achse und der Seitenflügelansätze sind im Querschnitt rund; sie werden um so länglicher, je näher sie zur Margina liegen. Im dreischichtigen Flügelbereich sind die prosenchymatisch. Die Protodermis wird zur Epidermis, deren Zellen an den Außenseiten konvex gekrümmt sind. Nach einiger Zeit obliterieren die prosenchymatischen Zellen der Mittelschicht an den Blütenblattträndern.

2. *Rhamnus frangula asplenifolia*. Auch bei *aspl.* wird wie bei *fr.* eine Mittelachse mit einem Leitbündel gebildet. Unterschiedlich wird die weitere Entwicklung des Blütenblattes in dem Entwicklungsstadium, in welchem bei der Normalform die Tätigkeit der marginalen

Initialen einsetzt. Es unterbleibt die Bildung der subprotodermalen Initiale, wahrscheinlich infolge des Fehlens der einleitenden, vom Leitbündel aus betrachtet, tangentialen Teilungen und der Bevorzugung der radialen Teilungsrichtung. Das Streckungswachstum erreicht die vielschichtige Randzone, und damit schließt das weitere Teilungswachstum ab. Alle Zellen werden parenchymatisch. Die folgende schematische Darstellung der Aufeinanderfolge der verschiedenen Meristeme zeigt noch einmal am Beispiel der Blütenblätter den Beginn der sichtbaren Störungen bei *aspl.*:



Die Ergebnisse der Blütenblattuntersuchungen zeigen, daß bei der Histogenese der Petalen die gleichen Entwicklungsvorgänge wie bei der Laubblattbildung, wenn auch in vereinfachter Form, stattfinden. Das Auswachsen von seitlichen Spreitenhälften wird bei den Laub- wie bei den Blütenblättern durch die Tätigkeit eines marginalen Meristems gegeben, dessen komplizierter Teilungsmechanismus bei den Petalen vereinfacht ist. Das Flächenwachstum findet bei den Laubblättern im Plattenmeristem statt, bei den Blütenblättern in dem weniger streng aufgebauten laminalen Meristem. Bei der schmalblättrigen Form ist sowohl bei den Laubblättern als auch bei den Blütenblättern die marginale Meristembildung gestört. Die Verhinderung der Ausbildung eines marginalen Meristems bei *aspl.* führt bei beiden Blattformen zu einer Spreitenreduktion, die bei den Petalen infolge der weniger strengen Teilungsfolge zum Teil ausgeglichen wird, während bei den Laubblättern Spreitenhälften erst über die Neuanlegung eines Ersatzspreitenmeristems ausgebildet werden können.

II. *Aesculus hippocastanum* L. und *Aesculus hippocastanum* L. *asplenifolia* Hort.

a) Beobachtungen an ausgewachsenen Blättern

Es wurden nur die Blätter von Endtrieben untersucht. Diese wachsen bei beiden Formen aus den Winterknospen aus und bilden an dem Frühjahrstrieb eine Reihe von Blattwirteln. Im Verlauf des Sommers werden noch neue Blätter angelegt. Sie bleiben aber in der Endknospe eingeschlossen, die sich dann zur Winterknospe umbildet. Bei *Aesculus hippocastanum* (*hipp.*) ist der Übergang von der Blattregion zur Region der Winterknospe sehr scharf abgegrenzt. Ab Mitte Mai werden keine neuen Blätter mehr ausgebildet. Die Überwinterungsknospen sind von dicken, verharzten Schuppenblättern umhüllt, die breite Ränder haben und sich gegenseitig überdecken. Bei *Ae. hipp. asplenifolia* (*aspl.*) ist dagegen der Übergang zwischen Sommertrieb und Winterknospen nicht scharf abgegrenzt. Die Triebe können während einer längeren Periode Blätter nicht nur anlegen sondern auch ausbilden, so daß noch im Juli neue Blätter auswachsen. Die Internodien werden dabei zur Triebspitze immer kürzer, und die Blätter drängen sich um die Endknospe, bis sie endlich an der Spitze selbst in einem dichten Büschel stehen. Die Knospenschuppen haben die gleiche Struktur wie bei *hipp.*, sind aber viel schmaler und überlappen sich deshalb nicht. Dadurch erhalten die Knospen bei dieser Form ihr kantiges Aussehen.

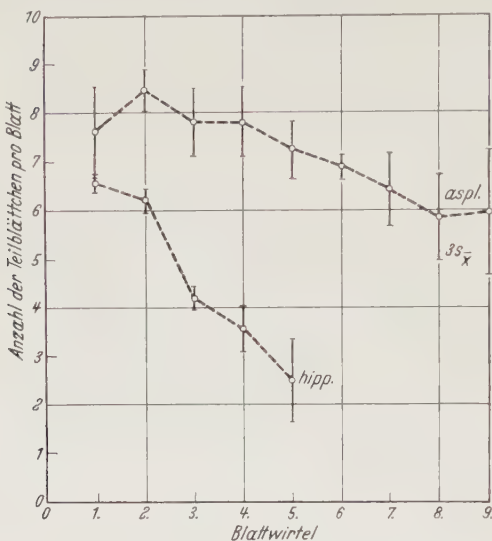
Die Blätter sind in Wirteln angeordnet. In der Anzahl der ausgebildeten Blattwirtel eines Triebes besteht entsprechend der verschiedenen Zahl von Blättern ein Unterschied zwischen beiden Formen. Bei *hipp.* finden sich an dem Trieb eines Sommers durchschnittlich $3,9 \pm 0,06$ Wirtel, bei *aspl.* $7,6 \pm 0,38$. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten ist bei einem *P*-Wert $P < 0,001$ ($t_{(85)} = 9,6$) signifikant. Die beiden Formen differieren

Tabelle 3.

Anzahl der Blattwirtel an Endtrieben von *Aesculus hippocastanum* und *Ae. hipp. asplenifolia*

	Wirtelzahl							Durchschnittliche Wirtelzahl	Varianz der Wirtelzahl	Freiheitsgrade	Varianzverhältnis F	P
	3	4	5	6	7	8	9					
<i>hipp.</i>	15	56	7					3,9	0,275	77	} 4,65	< 0,001
<i>aspl.</i>				2	2	3	2	7,6	1,278	8		

aber nicht nur in der Anzahl der Wirtel, sondern auch in den Streuungen, denen die Blattwirtelzahlen an den verschiedenen Endtrieben eines Baumes unterliegen. Die Tabelle 3

Abb. 10. *Aesculus hippocastanum*. Die Anzahl der Teilblättchen pro Blatt bei *hipp.* und *aspl.*

gibt das Ergebnis des Varianzvergleichs wieder. Die Verteilung der Blattwirtelzahlen der verschiedenen Endtriebe einer Form streut um ihren Mittelwert bei *aspl.* gesichert stärker als bei *hipp.* Die Blattwirtel bestehen bei *hipp.* aus zwei einander gegenüberstehenden Blättern. Bei *aspl.* sind es meist drei Blätter, die einen Wirtel aufbauen. Das dritte Blatt ist dabei mehr oder weniger über die anderen beiden emporggezogen.

Die Zahl der Teilblättchen, aus denen sich ein Blatt zusammensetzt, ist meist ungerade und bei beiden Formen verschieden. Bei *hipp.* nimmt ihre Zahl mit abnehmendem Alter der Blätter gleichmäßig von durchschnittlich 6,7 (d. h. 7 oder 5) auf 3,4 ab. Bei *aspl.* ist die Blättchenzahl größer und die relative Abnahme ist bei Blättern höherer Insertion geringer. Die Blätter des jüngsten Wirtels haben immer noch durchschnittlich 6,0 Teilblättchen, d. h. 5 oder 7. Die großen Unterschiede zwischen beiden

Formen machen eine weitere statistische Bearbeitung unnötig, vor allem auch, weil die für jeden Mittelwert in Abb. 10 eingezeichneten dreifachen mittleren Fehler ($3 s_x$) sich zwischen beiden Formen nicht überschneiden.

b) Die Morphogenese

Bei *hipp.* entstehen die Blattanlagen an dem stumpfen Vegetationskegel an zwei einander gegenüberliegenden Stellen gleichzeitig und greifen weit zur Kuppe des Vegetationskegels und zu den Seiten aus. Bei *aspl.* treten an dem in seiner Größe nicht veränderten Vegetationskegel die Blattanlagen als kleine, zuckerhutförmige Gebilde auf, die mit schmaler Basis der randlichen Partie des Kegels aufsitzen. Sie nehmen zwar an Breite zu, erreichen aber nie das Ausmaß von *hipp.* Außerdem werden die Blattanlagen nicht gleichzeitig ausgebildet. Die weitere Entwicklung der Primordien ist durch die Gliederung in das Ober- und Unterblatt charakterisiert. Sie erfolgt durch ein bevorzugtes Wachstum in basalen Teilen des Primordiums. Das Unterblatt umgreift, bei *hipp.* stärker, bei *aspl.* weniger stark, einen Teil der Peripherie des Vegetationskegels. Das Oberblatt ist kegelförmig ausgebildet. Da bei beiden Formen das Unterblatt wesentlich breiter als das Oberblatt ist, entsteht so ein oberer Rand des Unterblattes, der sich zum Oberblatt hinzieht und aus dem in der Nähe des Oberblattes Teilblättchen auswachsen. Dadurch ist die Gliederung des ausgewachsenen Blattes in die handförmig geteilte Spreite und den Blattstiel, der durch Auswachsen des Unterblattes entsteht, vorgebildet. Bei der Normalform (Abb. 11a) ist das Unterblatt schärfer abgesetzt als bei *aspl.* (Abb. 11b und c). Das Oberblatt besteht aus mehreren Teil-

blättchen, von denen das Endblättchen den höchsten Differenzierungsgrad erreicht hat. Auf seiner adaxialen Seite zieht sich von der Spitze bis zur Basis die Spreitenanlage als ein schmaler Saum an beiden Flanken herunter. Innerhalb dieses Spreitensaumes treten in regelmäßigen Abständen als Verdickungen die Seitennervenanlagen auf. Am nächsten Teilblättchenpaar ist zwar die Saumbildung schon eingeleitet, aber Seitennervenanlagen werden noch nicht sichtbar. Das jüngste Blättchenpaar ist noch völlig undifferenziert. In Abb. 11b ist zum Vergleich ein gleichgroßes Primordium der Form *aspl.* gezeichnet. Von den bereits angelegten Teilblättchen weist nur das Endblättchen einen Spreitensaum auf, der aber noch keine Seitennervenanlagen ausgebildet hat. Der Winkel, den die Längsachse des Blattes mit einer gedachten Ebene bildet, die durch die Ansatzstellen der Teilblättchen an den beidseitig vorgezogenen Flanken des Unterblattes gelegt sei, ist bei *aspl.* viel spitzer als bei *hipp.* Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Formen besteht in den Größenverhältnissen der verschieden alten Teilblättchenpaare. Bei *hipp.* nimmt die Größe der Blättchen vom terminalen zum jüngsten gleichmäßig ab, bei *aspl.* sind die Blättchenpaare im Vergleich mit dem Terminalblättchen viel kleiner und auch weniger differenziert.

Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß die Zone maximaler Wachstumstätigkeit — vom Querschnitt des Primordiums aus betrachtet — bei *aspl.* eingengt worden ist. Die Flanken des Primordiums liegen außerhalb der ausgezeichneten Wachstumszone und können mit der

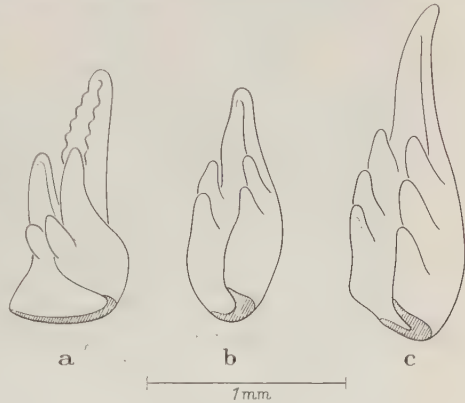


Abb. 11a—c. Junge Primordien von *Aesculus hipp.* (a) und *Aesculus hipp. aspl.* (b und c)

Entwicklung des Terminalblättchens und des Unterblatteiles, welcher unter diesem liegt, nicht Schritt halten. Dadurch wird der obere Rand des Unterblattes im Umfang ausgedehnter, und es können mehr Teilblättchen angelegt werden als bei der gestauchteren Normalform. Die bei *aspl.* auftretende Krümmung des Endblättchens zur Rückseite (Abb. 11c) deutet an, daß diese Einengung des Bereiches maximaler Wachstumstätigkeit nicht nur die seitlichen Flanken sondern auch die Dorsalseite betrifft.

Da an ausgewachsenen Blättern zwischen beiden Formen in dem Verhältnis der Teilblättchenlängen untereinander und zu dem Terminalblättchen keine Unterschiede festzustellen sind, ist anzunehmen, daß die beschriebene Wachstumsverzögerung der seitlichen Blättchen nur zeitweise besteht. Messungen der Wachstumsgeschwindigkeit sind wegen der starken Filzbildungen und Verharzung und wegen der Verkrümmungen bei *aspl.* nicht durchzuführen.

Wie kommt es nun zur Ausbildung der Spreiten? Es ist bereits erwähnt worden, daß an den Teilblättchen beider Formen von der Spitze bis zur Basis ein Randsaum gebildet wird. Bei *hipp.* verdicken sich in diesem Saum die Stellen der späteren Seitennerven. Das zwischen den Seitennervenanlagen liegende Blattgewebe wächst in die Breite und wirft sich dabei auf. Der weitere Entwicklungsablauf ist durch die Entfaltung der Spreitenhälften und durch das Fortschreiten des Breitenwachstums gekennzeichnet. Vor allem in der Nähe der Mittelrippe werden köpfchenförmige Trichome sichtbar. Auch bei *aspl.* wird die Spreitenausbildung durch eine anfängliche Randsaumbildung eingeleitet, aber in den darauf folgenden Entwicklungsstadien finden sich zur Normalform Unterschiede. War bei der letzteren die weitere Entwicklung des Randsaumes durch ein gleichmäßiges Wachstum von Seitennerven und Mesophyll charakterisiert, so tritt bei *aspl.* als zusätzlicher Faktor die Längsachse des Blattes auf. Je nach Stellung an dieser wird der angelegte Randsaum sich

mehr oder weniger gleichmäßig zu Seitennerven und Mesophyll entwickeln, oder aber es entstehen nur engbegrenzte Seitennervenanlagen. An jungen Blättern finden sich nur an den Blättchenenden breite Spreitenanlagen, die denen von *hipp.* ähneln. An den basalen Teilen der Blättchen entstehen erst nach der Entfaltung der Blätter engbegrenzte Seitennervenanlagen, die kaum Mesophyllränder aufweisen (Abb. 12).

Es ist also eine in der Längsrichtung der Blättchenachsen unterschiedliche zeitliche Differenzierungsordnung anzunehmen.

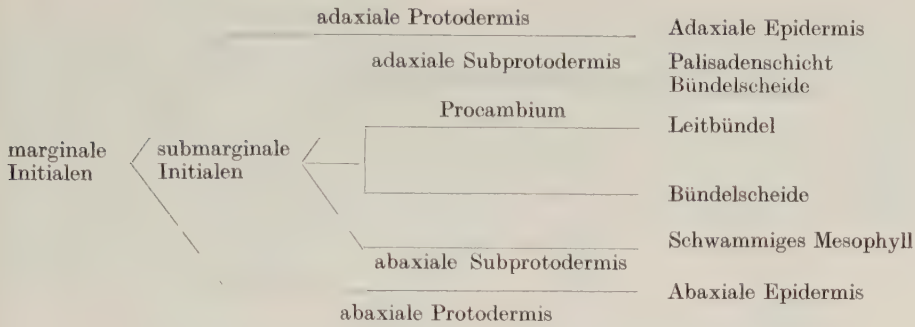


Abb. 12. Kleinere ausgewachsene Blätter von *Aesculus hipp.* und *Aesculus hipp. aspl.*

c) Die Histogenese

Bei einer Primordienlänge von 0,8—1 mm werden aus dem Unterblatt die Teilblättchen ausgegliedert. Diese Ausgliederung macht sich durch eine Deformierung des anfänglich runden Querschnittes bemerkbar, die ihre Ursache in Teilungen hat, die in verschiedenen protodermisnahen Schichten stattfinden. Im Ventralmeristem ist die Teilungstätigkeit außerordentlich rege. Die Abkömmlinge ziehen sich in mehr oder weniger streng ausgebildeten Reihen bis zum Procambium hin. In den angelegten Teilblättchen wird sehr schnell ein Procambium ausgebildet. An den Flanken treten die ersten Teilungen auf, die zur Ausbildung der Spreiten führen werden. So differenzieren sich aus dem meristematischen Querschnitt eine Reihe meristematischer Zonen heraus, die durch ihre Lage und durch ihre Leistung voneinander unterschieden sind, nämlich das Procambium, das marginale Meristem und das Ventralmeristem. Das marginale Meristem leitet durch seine Tätigkeit die weitere Spreitenausbildung ein. Im Gegensatz zu dem bei *Rhamnus* beschriebenen Teilungsmodus teilt sich aber die mittlere Zellschicht durch perikline Teilung noch einmal auf, so daß ein sechsschichtiges Plattenmeristem entsteht. Im folgenden Schema soll diese Teilungsweise verdeutlicht werden.

Nur an den Stellen, wo es zur Anlage von Seitennerven kommt, beginnt in der oberen der beiden mittleren Zellschichten die Anlage des Procambiums mit einer periklinen Teilung. Daneben ist auch in älteren Teilen des Plattenmeristems zwischen den Seitennerven die Anlage zusätzlicher Leitelemente zu beobachten. Die Tätigkeit des Ventralmeristems im Blattstiel und in den Mittelrippen der Teilblättchen führt bei beiden Formen zu einem aus-



gedehnten Polster meristematischer Zellreihen, aus dem sich meist drei Leitbündel ausdifferenzieren, die voneinander und von dem primären Leitbündel durch schmale Parenchymstreifen getrennt sind. Neben diesen nach innen gerichteten Abkömmlingen des Ventralmeristems treten auch zwischen den Spreitenanlagen Zellreihen mit der sie umgebenden Protodermis nach außen hervor, so daß es zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Höckerbildung kommt, die sich bis in die Stielregion herabzieht. Sie besteht aus der Protodermis und der ersten und zweiten subprotodermalen Schicht.

An ausgewachsenen Blättern sind zwischen den beiden Formen außer der verschiedenen starken Ausbildung und dem damit einhergehenden Entwicklungsgrad der Leitelemente keine histologischen Unterschiede zu erkennen. Auf die Epidermis und die einschichtige Palisadenschicht folgen die kleineren Anschlußzellen, die in das schwammige Mesophyll überleiten, das auf der Blattunterseite wieder mit der Epidermis abschließt. Die Leitbündel sind in eine Parenchymscheide eingebettet, die je nach Ausbildung des Leitgewebes bis zur Epidermis reichen kann.

Bei *aspl.* verläuft die Histogenese der Spreite in gleicher Weise wie bei *hipp.* Die Unterschiede in der Ausbildung der Spreite bei den beiden untersuchten Formen sind also nicht auf einen unterschiedlichen histologischen Entwicklungsmodus zurückzuführen, sondern sie beruhen auf einer veränderten Wachstumsrate des Marginal- und Plattenmeristems. Die Differenzierungsvorgänge, die zur Ausbildung der verschiedenen histologischen Elemente der ausgewachsenen Spreiten führen, sind nicht gestört.

III. *Betula pendula* ROTH. f. *youngi* C. SCHN. und *Betula pendula* ROTH. f. *dalecarlica* C. SCHN.

a) Die Morphogenese

Für die Untersuchungen standen als Normalform *Betula pendula youngi* (*pend.*) und als lacinierte Form *Betula pendula dalecarlica* (*dal.*) zur Verfügung. In frühen Primordialstadien lassen sich zwischen beiden keine Unterschiede in der Entwicklung der Blätter feststellen. Das junge Primordium wächst hauptsächlich in die Breite, bis es den Vegetationskegel kappenförmig umfaßt. Dann wird die Zunahme des Längenwachstums erkennbar. Die adaxiale Primordien-seite flacht sich ab, und die seitlichen Ränder erscheinen leicht vorgezogen. Auf der adaxialen Mittellinie treten lange, einzellige Haare auf, die das Primordium überragen können. Hat es eine Länge von 0,6 mm erreicht, werden zuerst im basalen Teil Seitennerven und das übrige Spreitengewebe angelegt. Von diesem Stadium an ist der Entwicklungsablauf der lacinierten Form von der normalen unterschieden.

1. *Betula pendula youngi*. Vom basalen Teil des Primordiums ausgehend entstehen aus den seitlichen Rändern der adaxialen Primordien-seite Spreitensäume, die in ihrem Wachstum an den Orten der späteren Seitennerven voraneilen (Abb. 13). Hier setzt im Gegensatz zu dem übrigen Gewebe ein verstärktes Dickenwachstum kurz hinter den voranlaufenden Spitzen ein. Die Seitennervenanlagen verdicken sich weiter, während das sie verbindende Mesophyll stärker in die Breite wächst. Dabei faltet es sich auf, und die plikative Knospelage wird erkennbar. Die Seitennervenanlagen verlängern sich, wobei die basalen in der Entwicklung vorangehen. Die Oberfläche des Blattes ist mit knopfförmigen Haaren bedeckt, die das ganze Blatt in einem immer dichter werdenden Rasen überziehen. Auf der Oberseite der Seitennerven entstehen außerdem einzellige Haare. Die weitere Ausbildung des Blättchens ist durch das Auftreten von Seitennerven höherer Ordnung charakterisiert. Ihre Entwicklung ist am

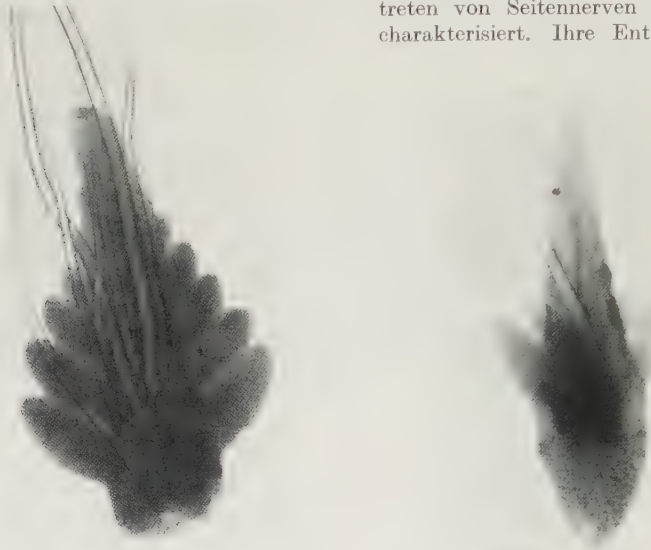


Abb. 13. *Betula pendula*. Junge Primordien der Form *youngi* (links, 1 mm lang) und *dalecarlica* (rechts, 1,6 mm lang)

basalen Rande des Blättchens besonders gut zu beobachten. Hier entstehen sie in gleicher Weise an den Flanken der Seitennerven 1. Ordnung wie diese an der Mittelrippe. Sie sind wiederum durch das sich nicht verdickende Mesophyll miteinander verbunden. Der Blattstiel ist abgesetzt und hat sich ebenso wie die Blattspitze leicht verlängert. Das immer größer werdende Blatt durchbricht dann die Knospenhülle, es entfaltet sich und erreicht im Laufe des Frühjahrs seine endliche Gestalt (Abb. 14).

2. *Betula pend. dalecarlica*. Im Unterschied zu *pend.* sind die ersten Spreitenanlagen auf die Zone der späteren Seitennervenanlagen beschränkt (Abb. 13). Das in gleicher Weise wie bei *pend.* verlaufende Dickenwachstum der Anlagen zeigt, daß nicht etwa eine Reduktion der Seitennervenanlagen stattgefunden hat, sondern daß das Mesophyll verspätet angelegt wird. Erst in einiger Entfernung von den voranwachsenden Spitzen der Seitennerven 1. Ordnung kommt es zur Bildung des übrigen Blattgewebes. Es erreicht aber bei weitem nicht die Ausdehnung wie bei *pend.*, sondern ist auf die Nähe der Mittelrippe und der Seitennerven erster und höherer Ordnungen beschränkt. Sein Flächenwachstum verbindet in späteren Entwicklungsstadien zwar die Seitennerven höherer Ordnung, die zu frühem Zeitpunkt voneinander isoliert aufwachsen, es ist aber auf der anderen Seite nicht stark genug, den bis auf der geringe Randzähnung glatten Umriß des normalen Blattes herzustellen. Trotzdem kann es in der Knospe vor allem in der Nähe der Mittelrippe zu geringer Auffaltung des Mesophylls kommen. Ein weiterer Unterschied zur Normalform ist das geförderte Längenwachstum der Mittelrippe und der Seitennerven. An jungen Blättern lassen sich aber exakte Messungen wegen der bei *dal.* auftretenden Verkrümmungen nicht anstellen.

Dal. unterscheidet sich also von *pend.* durch eine verzögerte Anlegung und vermutlich ein verzögertes Wachstum des Mesophylls und durch eine Förderung des Längenwachstums von Mittelrippe und Seitennerven. Die Stagnation der Wachstumsvorgänge am Ende der Wachstumsperiode setzt zu einem Zeitpunkt ein, in dem das Mesophyll sich zwar so weit ausgedehnt hat, daß es die Seitennerven höherer Ordnung miteinander verbindet, aber die freie Fläche zwischen den Spitzen der Seitennerven 1. Ordnung im Gegensatz zu *pend.* noch nicht hat ausfüllen können (Abb. 14). Bei *pend.* ist die Entwicklung der Nerven und des Mesophylls von vornherein zeitlich nicht getrennt.



Abb. 14. *Betula pendula*. Ausgewachsene Blätter, links von *youngi*, rechts von *dalecarlica*

b) Die Wachstumsgeschwindigkeit

Während des Frühjahrs 1954 wurde ähnlich wie bei *Rhamnus* auch bei *Betula* an wachsenden Blättern das Wachstum durch wiederholte Messungen verfolgt. Die Auswertung erfolgte wieder in der angegebenen Weise mit Hilfe der Regressionsrechnung. Die Wachstumsgeschwindigkeiten von Mittelrippen der Blätter verschiedener Stellung unterscheiden sich sowohl bei *pend.* als auch bei *dal.* nicht. Berücksichtigt wurden nur die ersten beiden Blätter von Endtrieben. Dagegen sind die Steigungen der Wachstumskurven zwischen einander entsprechenden Blättern von *dal.* und *pend.* unterschieden. Das erste Blatt von *dal.* wächst schneller in die Länge als das entsprechende von *pend.* Das gleiche gilt für das zweite Blatt.

Für die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit der Seitennerven eignete sich am besten der zweite Seitennerv der linken Spreitenhälfte, in der Blattaufsicht von der Blattbasis aus gezählt. Auch hier ergibt sich für *dal.* eine gesichert größere Wachstumsgeschwindigkeit des ersten wie auch des zweiten Blattes im Vergleich mit den Seitennerven der entsprechenden Blätter von *pend.* (Tabelle 4). Auf der anderen Seite sind zwischen den Seitennerven der Blätter 1 und 2 weder bei *pend.* noch bei *dal.* Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten zu sichern.

c) Die Größe ausgewachsener Blätter

Die Methode, die Größenunterschiede ausgewachsener Blätter zu vergleichen, ist durch die Varianzanalyse gegeben. Sie muß als „unvollständige Analyse“ durchgeführt werden, weil als Wiederholungen die verschiedenen untersuchten Triebe genommen wurden, die miteinander vertauschbar sind. Die Messungen erfolgten im August und September der Jahre 1953 und 1954. In die Berechnung der Blattlängen wurden die ältesten 6 Blätter

Tabelle 4. Die Geschwindigkeit des Längenwachstums der Blätter von *Betula pendula youngi* und *B. p. dalecarlica*

Form	Blatt Nr.	Längenwachstum der Mittelrippe				Längenwachstum der Seitennerven			
		Regressions- koeffizient <i>b</i>	mittlerer Fehler	Zahl der Mes- sungen	<i>t</i>	<i>P</i>	Regressions- koeffizient <i>b</i>	mittlerer Fehler	Zahl der Mes- sungen <i>t</i>
<i>Betula pendula youngi</i>	1	0,0090	0,00148	10	7,6	<0,001	0,0037	0,00097	8
	2	0,0100	0,00082	9			0,0054	0,00179	
<i>Betula pendula dalecarlica</i>	1	0,0288	0,00628	8	9,2	<0,001	0,0173	0,00492	8
	2	0,0357	0,00663	8			0,0197	0,00425	

Tabelle 5. Länge der ausgewachsenen Blätter von *Betula pendula youngi* und *B. p. dalecarlica*
a) Mittelwerte
b) Endanalyse

Blatt Nr.	Durchschnittliche Länge in mm		Zahl der Messungen je	Frei- heits- grade			Ab- weichungs- quadrate	Varianz	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
	<i>young</i>	<i>dal.</i>										
1	32,1	55,8	13	1			45 254,1	45 254,1	710,88	<0,001	151,8	<0,001
2	39,6	70,0	13	24			7 154,4	298,100	4,68	<0,001		
3	39,6	79,2	13	5			8 063,5	1 612,70	25,33	<0,001	3,83	0,01—0,001
4	47,2	81,6	13	5			1 207,6	241,520	3,83	0,01—0,001		
5	43,2	79,9	13	120			7 639,1	63,659				
6	45,1	83,9	13	155								
	41,1	75,2	78	Total								

von Endtrieben einbezogen. Die Endanalyse (Tabelle 5b) ergibt, daß gegenüber zufälligen Versuchsfehlern gesicherte Differenzen zwischen *pend.* und *dal.* ($F = 710,9$, $P < 0,001$) bestehen. Da aber noch nicht die Möglichkeit ausgeschlossen ist, daß diese Differenzen durch die große Streuung zwischen den verschiedenen Trieben nur vorgetäuscht sind, da ja auch die Unterschiede zwischen den verschiedenen Trieben sehr gut gesichert sind, muß eine noch eingehendere Prüfung erfolgen. Das Varianzverhältnis zwischen Formen und Wiederholungen $V_F/V_w = 151,8$ führt zu einem P -Wert $< 0,001$, der anzeigt, daß die beiden Formen sich tatsächlich in der Blattlänge unterscheiden. Die Blätter von *dal.* sind gesichert länger als die von *pend.*

Weiterhin muß gefragt werden, ob die einzelnen Blätter der Blattfolge verschieden groß sind, und sollte dies der Fall sein, ob derartige Unterschiede zwischen Blättern verschiedener Stellung bei beiden Formen in gleicher Größe auftreten, oder ob sie sich in dieser Hinsicht unterscheiden. Die Endanalyse ergibt, daß die Blätter verschiedener Stellung (Bl) voneinander differieren. Die Mittelwerte sind in der Tabelle 5a gegeben. Die zweite Frage wird durch die Prüfung der Kombinationswirkung von Blättern und Formen ($Bl \times Fo$) beantwortet. Ein P -Wert von $0,01-0,001$ ($F = 3,83$) sagt aus, daß sehr wahrscheinlich diese Veränderungen innerhalb der Blattfolge bei *pend.* anderer Natur sind als bei *dal.*

Ganz entsprechend wurde auch die Größe der Blätter von Seitentrieben untersucht. An ihnen treten im allgemeinen nur zwei Blätter auf. Die Blattlängen sind auch hier zwischen *pend.* (durchschnittlich 65,4 mm) und *dal.* (durchschnittlich 74,1 mm) gesichert verschieden.

d) Die Histogenese und Histologie

In der schon mehrmals beschriebenen Art entsteht an den Flanken des Primordiums ein an der Margina aus fünf Zellschichten bestehendes Plattenmeristem, dessen mittlere Schicht sich in geringer Entfernung vom Rande verdoppelt. Dann verwirren Teilungen, die die Procambiumbildung von Seitenerven einleiten, das Bild. In Querschnitten durch ältere Blätter ist zwischen den Nerven ein mehr oder weniger regelmäßiges sechsschichtiges Plattenmeristem zu erkennen, in dessen mittleren Zellschichten perikline Teilungen auftreten, die die Bildung der Nervatur höherer Ordnung einleiten. Die Zellen der äußeren Schichten unterscheiden sich von den übrigen Zellen des Plattenmeristems durch eine schon sehr früh auftretende starke Einlagerung brauner Substanzen.

Die ausgewachsenen Blätter bieten im histologischen Aufbau keine Unterschiede zwischen den beiden Formen. Auf die Epidermis der Blattoberseite folgt die einschichtige Palisadenlage, die über kleinere Anschlußzellen in das schwammige Mesophyll übergeht. Der Abschluß ist an der Blattunterseite wieder durch die Epidermis gegeben. Die Epidermiszellen über der Nervatur sind wie bei *Rhamnus* und *Aesculus* kleiner als die übrigen und langgestreckt. Die Epidermiszellen der Interkostalfelder sind auf der Blattunterseite bei *pend.* beträchtlich kleiner als bei *dal.* Bei *pend.* finden sich als Mittelwert von 6 Messungen $4714 \pm 136,1$ Zellen je mm^2 , bei *dal.* $3260 \pm 104,7$ Zellen je mm^2 . Der Unterschied ist statistisch gesichert ($t_{(10)} = 8,5$, $P < 0,001$). Als weiterer Unterschied ist die gesichert größere Dichte der Spaltöffnungen auf der Blattunterseite von *dal.* anzuführen. Bei *pend.* wurde aus 6 Messungen ein Mittelwert von $15,9 \pm 1,99$ Spaltöffnungen je mm^2 und bei *dal.* ein solcher von $26,5 \pm 1,51$ Spaltöffnungen je mm^2 errechnet.

IV. *Corylus avellana* L. und *Corylus avellana* L. f. *laciniata* PETZ et KIRCH.

a) Die Morphogenese

Der Entwicklungsgang der Blätter ist im großen und ganzen ähnlich dem bei *Betula* beschrieben. Bei beiden Formen von *Corylus* werden aber nicht wie bei *Betula* die beiden Spreitenhälften an den Seiten der Primordienachse angelegt sondern mehr zur adaxialen Seite verschoben. Sie wachsen also nicht von vornherein in der Ebene ihrer zukünftigen Ausbreitung aus sondern senkrecht dazu. Die Anlegung der Spreiten erscheint bei der laciniaten Form verzögert zu sein. Dies wird aus der Abb. 15 deutlich, in der zwei gleich alte Blätter gezeichnet sind. Die ausgewachsenen Blätter der zerschlitztblättrigen Form zeigen im Vergleich zur Normalform eine geringere Spreitenreduktion, als es bei *Betula* der Fall

ist (Abb. 16). Die Buchten zwischen den Nerven greifen weniger tief in die Blattfläche ein. Auf der anderen Seite geht die Reduktion aber doch so weit, daß die bei mittleren Blättern von *C. avellana* auftretende Peltation bei *C. avellana laciniata* nicht mehr vorkommt. In der Wachstumsgeschwindigkeit und der Größe der ausgewachsenen Blätter sind zwischen beiden Formen keine Unterschiede zu sichern.



Abb. 15 a u. b

Abb. 16

Abb. 15 a u. b. *Corylus avellana*. Junge Primordien der normalen (a) und der laciniaten Form (b)
Abb. 16. Beblätterte Zweige von *Corylus avellana* (links) und *Corylus avellana* f. *laciniata* (rechts)

b) Die Histogenese und Histologie

Die Entwicklung der Blätter verläuft auch während der Histogenese in der für *Betula* beschriebenen Art. Gleich ist auch die Struktur der ausgewachsenen Blätter. Ein Unterschied zu *Betula* besteht aber in dem Bau der Trichome. Zeigten sie bei *Betula* eine peltate Struktur, so sind es hier einfache Haare, die fast nur im Bereich der Nervatur auftreten. Die Haarentwicklung beginnt bei der laciniaten Form früher als bei der ganzrandigen. Auf der Blattunterseite sind ebenso wie bei *Betula* die Epidermiszellen in den Interkostalfeldern der laciniaten Form gesichert gegenüber denen der Normalform vergrößert. Bei *C. avell.* fanden sich $7277 \pm 184,4$ Zellen je mm^2 , bei *C. av. laciniata* $2782 \pm 265,0$ Zellen je mm^2 ($t_{(10)} = 13,9$, $P < 0,001$). In der Zahl der Spaltöffnungen unterscheiden sich die beiden Formen signifikant. Durchschnittlich $26,5 \pm 2,70$ Spaltöffnungen je mm^2 bei der Normalform stehen durchschnittlich $90,2 \pm 6,01$ Spaltöffnungen je mm^2 bei der laciniaten Form gegenüber ($t_{(10)} = 9,7$, $P < 0,001$).

V. Die Beeinflussung der Blattform durch Wuchs- und Hemmstoffe

In der Literatur wird häufig für die Ausbildung der Blattform eine unterschiedliche Wuchsstoffkonzentration in verschiedenen Teilen des Blattes verantwortlich gemacht (AVERY 1935, WENT und THIMANN 1937). Um zu prüfen, ob Veränderungen der Blattform, die durch Applikation von Wuchs- und Hemmstoffen erreicht werden können, mit den hier behandelten Veränderungen parallel laufen, wurden Knospen von *Rhamnus frangula* und *Rhamnus frangula asplenifolia* während des Austreibens wiederholt mit Wuchs- und Hemmstoffen behandelt.

Appliziert wurde durch Eintauchen der Knospen in wirkstoffhaltige Lösungen (am 7. 4., 26. 4. und 5. 5. 54) oder durch Bestreichen anderer Knospen mit wirkstoffhaltigen Lanolinpasten (am 27. 2., 10. 3. und 23. 3.). Als Wirkstoffe dienten β -Indolylessigsäure (IES, Merck) in den Konzentrationen 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-5} g/g Paste bzw. Wasser; das Na-Salz der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D, Bayer) in den Konzentrationen 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} g/g Paste bzw. Wasser und 2,3,5-Trijodbenzoesäure in den Mengen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} g/g Paste.

Eine formative Wirkung der Trijodbenzoesäure konnte nicht festgestellt werden. Bei der stärksten Konzentration wurden die Knospen am Austreiben verhindert und starben bald ab. Die durch IES und 2,4-D hervorgerufenen Veränderungen der Blattgestalt erwiesen sich als gleichartig, nur war der Schädigungsgrad, der durch IES erreicht wurde, weniger stark, als der durch 2,4-D-Behandlung erzielte. Dabei entsprach einer IES-Konzentration von 10^{-3} g IES je g Wasser eine 2,4-D-Konzentration von 10^{-5} g 2,4-D je g Wasser. Die IES-Konzentration 10^{-2} g/g Paste verhinderte die Knospen am Austreiben. Bei der Konzentration 10^{-5} g IES je g Wasser konnte kein Effekt erkannt werden. Bei der Behandlung mit 2,4-D wurde der schwächste Schädigungsgrad bei einer Konzentration von 10^{-5} g/g Wasser gefunden. Bei den Blättern von *Rh. frangula* war das Verhältnis des Nervenwachstums zu dem des Mesophyllwachstums zugunsten des ersteren verschoben. Die Mittelrippe wird im mittleren Spreitenteil im Verhältnis zur Spreite zu lang. Dadurch kommt es zu einer napfförmigen Einkrümmung der Spreite. Ebenso wachsen die Seitennerven stärker als das sie umgebende Mesophyll. Das Ergebnis der ungleichen Wachstumsverteilung ist eine Kräuselung der Spreitenfläche. Vor allem bei den älteren Blättern der behandelten Knospen wird die Spreitenspitze in der Entwicklung gehemmt. Im ganzen sind etwa soviel Blätter in der Entwicklung gestört wie bei der Behandlung schon angelegt waren. Bei *Rh. fr. asplenifolia* sind die Blattachsen zur adaxialen Seite gekrümmt.

An den mit einer 2,4-D-Konzentration 10^{-4} g/g Wasser behandelten Knospen waren eine ganze Reihe anderer, verschieden schwerer Störungen festzustellen. Am stärksten erwies sich die Entwicklung an den ältesten Blättern der Blattfolge abgeändert. Sie starben nach wenigen Wochen ab. Die nächstfolgenden Blätter blieben lebensfähig, erreichten aber bei weitem nicht ihre natürliche Größe. Die Ausbildung des Leitgewebes war außerordentlich stark gefördert. Die gesamte Spreitenfläche wird bis auf einen schmalen grünen Rand völlig von den Nerven gebildet, die dicht aneinander liegen. Das Längenwachstum der Blattmittelrippe ist vor allem an der Blattspitze im Gegensatz zu den hier verlaufenden Seitennerven stark gehemmt. So kommt es zu Verkrümmungen im oberen Blatteil. Im nächstfolgenden Blatt werden die Schädigungen schon geringer. Gegenüber den Kontrollen sind die Seitennerven immer noch stark ausgebildet und münden in einem spitzeren Winkel in die Mittelrippe. Ihr Verteilungsmuster ist regellos, es finden sich aber zwischen ihnen grüne Mesophyllflächen. Die Mittelrippe bleibt im distalen Teil weiterhin gehemmt. Der Blattrand ist häufig gewellt. Im folgenden Blatt klingen die Schädigungen merklich ab. In der Blattspitze ist die Nervenverteilung zwar noch gestört, ebenso wie das Wachstum der Mittelrippe, aber der basale Spreitenanteil ist meist schon normal ausgebildet. Auffällig ist, daß zufällig mit in die Wirkstofflösung hineingeratene ältere Blätter, die bei der Behandlung schon auf einem späteren Entwicklungsstadium standen, nicht die geschilderten schweren Schädigungen aufwiesen, sondern mehr dem bei der 2,4-D-Konzentration 10^{-5} g/g Wasser auftretenden Typus entsprechen. Bei *Rh. fr. asplenifolia* beschränken sich die Behandlungsschädigungen wieder nur auf Verkrümmungen der Blattachsen.

D. Besprechung der Ergebnisse

1. *Die Meristeme und die Entwicklung der Blattspreiten.* Bei der Morphogenese eines Blattorgans lassen sich zwei Entwicklungsvorgänge voneinander unterscheiden. Es ist dies einmal die Entstehung der Meristeme als Folge der Teilungstätigkeit der einzelnen Zellen und zweitens das Streckungswachstum und die Differenzierung der Zellen.

Als erstes sollen die Meristeme besprochen werden. Bei der Entwicklung der Spreite leiten sie sich ohne Einschubung einer Ruhepause direkt von den

Meristemen des jungen Blattprimordiums ab. Diese Vorgänge gleichen sich bei allen untersuchten Arten und Formen weitgehend. Der ganze Querschnitt des jungen Primordiums besteht anfänglich aus meristematischem Gewebe. Im weiteren Verlauf des Längen- und Erstarkungswachstums treten dann die ersten Teilungen auf, die die Anlage der Blattspreiten anzeigen. Auf der abaxialen Seite der späteren Blattmittlerippe gehen die Zellen dazu über, ihre Teilungstätigkeit einzustellen, in mittleren Teilen wird die Procambiumanlage sichtbar, und die ersten Teilungen eines sich ausbildenden Ventralmeristems deuten auf die spätere Ausbildung von parenchymatösen Zellreihen auf der adaxialen Seite.

Diese von der abaxialen zur adaxialen Seite des Primordiums verlaufende Differenzierungsordnung braucht aber nicht unbedingt die Anlegung der Blattspreiten zu verursachen. So sind große Teile des Blattes von *Aesculus hipp. asplenifolia* trotz normaler Achsenausbildung völlig spreitenlos. Besonders auffällig erscheint bei dieser Form der Unterschied in der Ausbildung der Blattspreiten zwischen den Blättchenspitzen und den unteren Blättchenabschnitten. Es muß entlang der Spreitenachse eine Differenzierungsordnung Einfluß auf die Ausbildung der Spreiten nehmen. Diese Ordnung ist bei *Ae. hipp. aspl.* in proximalen Blättchenabschnitten gestört. Wie diese Ordnung im jungen Blatt zur Wirksamkeit gelangt, kann nicht gesagt werden, es liegt aber der Gedanke an physiologische Gradienten nahe. Wenn man die frühe Entwicklung der Spreiten bei *Rhamnus frangula* und *Aesculus hippocastanum* betrachtet, so kann in beiden Fällen in der Mitte des Blattes die erste Spreitenanlage beobachtet werden. Dann folgen zur Spitze und zur Basis die weiteren Spreitenabschnitte. Bei *Betula* geht die Ausbildung der Spreitenanlage von der Primordienbasis aus. Die Grundgestalt der Blätter kann so bis auf die erste Spreitenanlage selbst zurückgeführt werden, denn die Primordienteile, die mit der Spreitenanlage vorausgehen, sind diejenigen Abschnitte am fertig ausgebildeten Blatt, die die stärkste Entwicklung erfahren haben.

Neben diesen in der Längsrichtung des Blattes verlaufenden Differenzierungsschritten soll kurz auf die Beziehungen der Spreitenanlagen zueinander in seitlicher Richtung hingewiesen werden. In den Normalfällen werden sie im allgemeinen in gleicher Höhe gleichzeitig angelegt. Die Blätter von *Ae. hipp. asplenifolia* zeigen dagegen, daß dies nicht unbedingt der Fall zu sein braucht. Das bedeutet gleichzeitig, daß sich die Anlegung der beiden Spreitenanlagen wohl voneinander unabhängig vollziehen kann. Dieser Schluß kann auch für die weitere Ausbildung der Spreite ausgedehnt werden, denn es gibt sehr viele Blattformen, die asymmetrisch ausgebildet sind, so zum Beispiel in extremer Weise bei den Blättern von *Oenothera* unter dem Einfluß des Gens *falcifolia*.

Die Spreitenanlagen fallen durch den schon bei ihnen vorhandenen komplizierten Teilungsmechanismus des späteren Marginalmeristems auf. Auf diesen Mechanismus geht der Schichtenbau des Plattenmeristems zurück. Fallen wie bei *Rhamnus fr. asplenifolia* perikline Teilungen aus, so kann eine weitere Ausbildung der Spreitenanlage nicht stattfinden. Es erhebt sich nun die Frage, wie die Tätigkeit des marginalen Meristems mit dem des Plattenmeristems verknüpft ist. Hierüber geben die Untersuchungen am Ersatzspreitenmeristem von *Rh. fr. aspl.* Aufschluß. Die anfänglich ungeordneten Zellhaufen des Ersatzspreitenmeristems zeigen während ihrer weiteren Entwicklung ein an Einfluß

gewinnendes Ordnungsprinzip. Es entsteht ein schichtenförmiger Aufbau des Meristems. Dieses neue „Plattenmeristem“ ist aber nicht wie bei der Normalform 5- sondern 7 -schichtig. Das bedeutet, daß der meristematischen Spreite Ordnungstendenzen eigen sind, die nicht unbedingt an die Tätigkeit eines Randmeristems gebunden sind. Darüber hinaus darf man annehmen, daß diese zu einem Schichtenbau der Spreitenmeristeme führenden Tendenzen sich nicht nur auf eine bestimmte Zellschicht der Primordienachse erstrecken, denn bei der Normalform von *Rhamnus* entwickelt sich die Spreite im großen und ganzen aus subprotodermalen Initialen, während bei der abweichenden Form viel tiefer im Innern der Blattachse liegende Zellen das Ersatzspreitenmeristem ausbilden. Die Untersuchungen AVERYs an *Nicotiana* (1933) haben gezeigt, daß die Ausbildung der Blattform und die Vergrößerung der Blattfläche auf ein unterschiedliches Wachstum („localized growth“) und eine unterschiedliche Wachstumsrichtung („polarized growth“) der verschiedenen Abschnitte der jungen Spreiten zurückzuführen ist. Diese Befunde besagen, daß für die Ausbildung der Blattform das Wachstum des Plattenmeristems entscheidend ist. So ist als Ursache für die Zerschlitzung der Blätter nicht nur eine verzögerte Anlegung heranzuziehen, sondern die vergrößerten Zellen der laciniaten Blätter deuten bei Berücksichtigung der Spreitenreduktion außerdem auf eine verringerte Teilungsrates in diesem Blatteil hin.

Im vorgehenden ist nur von Spreitenanlagen gesprochen worden. Es muß aber zwischen den Anlagen der Seitennerven und denen des Mesophylls unterschieden werden. Im Normalfall wird hinter dem Blattrand im Plattenmeristem die Procambiumbildung der Seitennerven sichtbar. Bei der laciniaten Form von *Betula* beschränken sich die ersten Spreitenanlagen auf Seitennerven. Das gleiche gilt auch für die unteren Abschnitte der Teilblättchen von *Ae. hipp. asplenifolia*. Erst in späteren Entwicklungsstadien wird bei *Betula* dann das die Nervenanlagen verbindende Mesophyll angelegt. Bei den schlitzblättrigen Formen läßt sich aus diesen Beobachtungen ein Einblick in das Verhältnis von Nerven- zu Mesophyllwachstum gewinnen. Man muß annehmen, daß schon bei der ersten histologisch sichtbaren Spreitenanlage die Determination stattgefunden haben muß, die darüber entscheidet, ob ein Seitennerv gebildet wird, oder ob an dieser Stelle Mesophyll die Endstufe der Entwicklung sein wird. Das bedeutet, daß in der für die Längsrichtung der Primordien beschriebenen Differenzierungsordnung Faktoren enthalten sind, die das Seitennervennmuster beeinflussen. Dieses Muster kann gestört sein, so bei *Ae. hipp. aspl.*, es kann aber auch bei den Blättern mit abweichender Blattform unverändert während der Morphogenese vorhanden sein (*Corylus* und *Betula*). Dieser Befund sagt aber auch, daß das Mesophyllwachstum von dem Nervenwachstum unabhängig verläuft, denn bei *Aesculus aspl.* finden sich an den Blattspitzen Nerven und Mesophyll, an den unteren Abschnitten nur Nerven, bei *Betula* während der ersten Entwicklungsschritte nur Nervenanlagen.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden, die WENT und THIMANN (1937) und WENT (1951) zusammenfassen, überein. Die genannten Autoren zeigen, daß das Nervenwachstum andere Faktoren benötigt als das Mesophyllwachstum und kommen auf Grund dieser physiologischen Untersuchungen zu dem gleichen Ergebnis. So sagt WENT, daß die Entstehung einer unterschiedlichen Blatt-

gestalt in der Normogenese eine Folge eines unterschiedlichen Verhältnisses von mesophyll- und nervenfördernden Faktoren ist. Gegen diese Befunde wendet sich, vom Wuchsstoffproblem herkommend, WENCK (1952) und vertritt die Ansicht, daß Wuchsstoffe sowohl Mesophyll- als auch Nervenwachstum beeinflussen.

Wenn man nun aber annimmt, daß die Determination der Seitennerven schon in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der Spreitenanlage abgelaufen ist, erhebt sich die Frage, wie es zur Bildung der Nerven Elemente der Ersatzspreite von *Rhamnus fr. asplenifolia* kommen kann. Diese kleinen Nerven münden in einer Vielzahl nach Art der Seitennerven in die Blattmittellippe ein, der normale Determinationsvorgang dürfte aber schon abgelaufen sein, bevor die ursprüngliche Spreitenanlage in ihrer Entwicklung steckengeblieben ist. Es ergeben sich nun zwei Möglichkeiten. Entweder handelt es sich um echte Seitennerven, deren Determination auch in der Ersatzspreite in gleicher Weise erfolgt ist wie bei dem normalen Blatt, oder aber die „Seiten“nerven entsprechen der feineren Nervatur des normalen Blattes. Gegen die erste Deutung spricht das völlig veränderte Muster. In der Ersatzspreite sind es sehr viele kleine, unverzweigte Elemente, die nicht wie normale Seitennerven an dem Spreitenrande vorwachsen, sondern wie die feinere Nervatur des normalen Blattes im Plattenmeristem sich aus den meristematischen Zellen entwickeln. Es hat den Anschein, als ob es sich hier um Elemente, die der feineren Nervatur entsprechen, handelt. Träfe dieser Fall zu, so müßte man annehmen, daß die Determination der Seitennerven an die spezielle Struktur des marginalen Meristems, zumindest aber an die subprotodermalen Schichten der Achse gebunden sei oder nur begrenzte Zeit wirken könnte.

Die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit der Seitennerven und der Mittelrippe hatte erhöhte Werte bei den Blättern mit veränderter Blattform ergeben. Auch an ausgewachsenen Blättern waren diese Blatteile gegenüber den Normalformen verlängert geblieben. Eine ähnliche Beobachtung teilt LOEWER (1896) von Blättern der Form *Tilia americana asplenifolia* mit. Ist hierin nur der Ausdruck der geforderten Selbständigkeit der Hauptleitelemente oder auch das Mitwirken eines Ernährungsfaktors zu sehen? Für die letzte Deutung könnte ein Hinweis in der Verbreiterung der Ersatzspreiten von Blättern an Stockausschlägen der Form *Rhamnus fr. asplenifolia* zu sehen sein, vielleicht auch in der stärkeren Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit in der Blattfolge bei den abweichenden Blättern. GOEBEL (1928, S. 563) führt vergrößerte Blätter an Stockausschlägen auf diese Ursache zurück.

Offen bleibt die Frage nach der Rolle der Protodermis in der Morphogenese der Spreiten. Als wichtige Tatsache muß hervorgehoben werden, daß sie während der gesamten Entwicklung ihre antikline Teilungsrichtung beibehält. Selbst bei der Bildung der Ersatzspreite von *Rhamnus* bleibt sie unbeeinflusst und macht nur die Vergrößerung des untergelagerten Gewebes plastisch mit. Hierin zeigt sich ohne Zweifel eine gewisse Selbständigkeit. Wieweit die Protodermis organisierend in die Entwicklungsvorgänge eingreift, bleibt hier offen. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß bei der monokotylchimären *Solanum tubigense* die Blattgestalt Veränderungen unter dem Einfluß der Protodermis erleidet (WINKLER 1908).

2. *Die Zelldifferenzierung.* Neben den Zellteilungen in den Meristemen ist als zweite Komponente der Morphogenese die Ausdifferenzierung der Zellen zu nennen. Es handelt sich hier um die eigentlichen Wachstumsvorgänge der Zellen, die schon während der Embryonalperiode beginnen und mit wachsendem Differenzierungsgrad der Meristeme zunehmen. Ihr Ende finden sie erst nach dem Aufhören der Teilungstätigkeit. Eine nähere Untersuchung der Beziehungen des Teilungs- zum Streckungswachstum war an dem vorliegenden Material nicht möglich, denn um Messungen der Zellgrößen während der Entwicklung vergleichen zu können, ist es unbedingt erforderlich, daß die zu untersuchenden Blätter während einer gleichlangen Entwicklungszeit gleichen äußeren und inneren Bedingungen gegenübergestanden haben, und daß sie sich in vergleichbarer Stellung am Hauptsproß befinden. Diese Forderungen, die bei BINDLOSS (1942) in seiner Arbeit über Sprosse von *Lycopersicum esculentum* und *Zinnia elegans* mit großer Nachdrücklichkeit ausgesprochen werden, können an den untersuchten Bäumen nicht erfüllt werden. So war es hier nur sinnvoll, nach qualitativen Unterschieden zwischen den normal und abweichend geformten Blättern zu suchen. Weder im histologischen Aufbau noch in dem Verhältnis der einzelnen histologischen Elemente zueinander waren zwischen den zu vergleichenden Formen wesentliche Unterschiede festzustellen. Selbst die von dem Ersatzspreitenmeristem von *Rhamnus fr. asplenifolia* ausgebildete Spreite war vom histologischen Standpunkt aus betrachtet von einer normalen Spreite kaum zu unterscheiden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Ausdifferenzierung der Zellen von den in dem ersten Abschnitt beschriebenen Vorgängen der Zellteilungen in den Meristemen unabhängig ist. Das Beispiel von *Rhamnus* zeigt außerdem, daß die Ausdifferenzierung nicht an eine bestimmte Teilungsfolge gebunden ist, der Zellen eines bestimmten Ursprungs unterliegen. Ähnliches beschreibt RENNER (1936): Zellen des Protoderms, die bei randpanaschierten Formen infolge von Periklinalteilungen in das Innere des Mesophylls eingegliedert werden, verhalten sich während der Ausdifferenzierung der neuen Lage entsprechend. ROTH und FAST (1954) geben von Excrescenzen bei *Anthurium Scherzerianum* SCHOTT. an, daß sie aus einem subepidermalen Reihenmeristem („Dorsalmeristem“) entstehen und im ausgewachsenen Zustand den gleichen histologischen Aufbau wie die durch ein „Randmeristem“ entstandenen normalen Spreiten aufweisen. Es zeigt sich also auch hier die Unabhängigkeit der Zelldifferenzierung von der Herkunft und dem Meristemtyp, aus dem die Zellen stammen.

3. *Der Einfluß von Wuchsstoffen auf die Blattentwicklung.* WENCK (1952) schreibt Wuchsstoffen eine entscheidende Rolle bei der Determination der Blattform zu. Sie sollen das Mesophyll- und Nervenwachstum kontrollieren. Dies widerspricht der von AVERY (1935) zuerst ausgesprochenen Ansicht, daß Wuchsstoffe nur das Nervenwachstum im Blatt fördern. WENT und THIMANN (1937) und WENT (1938, 1951) trennen dann scharf zwischen Faktoren, die dem Nervenwachstum und solchen, die dem Mesophyllwachstum förderlich sind. Als mesophyllfördernde Stoffe konnten BONNER, HAAGEN-SMITH und WENT (1937) und BONNER und HAAGEN-SMITH (1939) Aminosäuren und Purine, speziell Adenin, nachweisen. In dieser Arbeit kann keine Entscheidung über die beiden entgegengesetzten Ansichten gebracht werden, der Sinn der Versuche mit Wuchs- und

Hemmstoffen war vielmehr, nur einen Hinweis zu erhalten, ob die untersuchten Veränderungen der Blattentwicklung auf eine direkte Störung des Wuchsstoffhaushaltes zurückzuführen sind. Wäre dies der Fall, wären analog den von WENCK gefundenen Effekten nach Applikation von Wuchsstoffantagonisten, in diesem Fall Trijodbenzoesäure, bei *Rhamnus fr. asplenifolia* vor Anlegung der Ersatzspreite eine Aufhebung der Spreitenreduktion und nach Applikation von Wuchsstoffen bei *Rhamnus fr.* eine Spreitenreduktion zu erwarten gewesen. Die Versuche ergaben aber keine morphogenetischen Effekte von Trijodbenzoesäure. Die durch Wuchsstoffe hervorgerufenen Veränderungen sind genau die gleichen, wie sie von BURTON (1947), WATSON (1948), ZIMMERMANN (1942), McILLRATH, ERGLE und DUNLAP (1951), McILLRATH und ERGLE (1953a, b) u. a. beschrieben wurden. Anatomische Untersuchungen an den veränderten Blättern (GIFFORD 1953, WATSON 1948, BURTON 1947) haben gezeigt, daß bei den behandelten Blättern das Marginalmeristem und Plattenmeristem im Aufbau nicht verändert sind. Erst die sich ausdifferenzierenden Zellen schlagen einen anderen Weg in ihrer Weiterentwicklung ein und bilden sich entweder zu Zellen des Leitgewebes und der parenchymatischen Bündelscheibe um, die dann gemeinsam die ganze Spreite aufbauen können, oder sie bleiben meristematisch und bilden ein „laminares Ventralmeristem“, aus dem sich akzessorische Leitbündel ausdifferenzieren. Bei geringeren Wuchsstoffapplikationen kam es nur zu einer Förderung der schon vorhandenen Leitelemente. Nach WATSON (1948) erfolgt die größte Veränderung des Entwicklungsablaufs bei Blättern, deren Zellen sich bei der Behandlung im Stadium der beginnenden Zelldifferenzierung befinden. Hört der Wuchsstoffeinfluß auf, werden die Blätter wieder normal ausgebildet. Die Behandlungen bei *Rhamnus fr.* führten zu den gleichen Ergebnissen.

Die Versuche mit Wuchsstoffen ergeben also, daß sie bei der Morphogenese der Blätter von *Rhamnus fr.* anscheinend erst in Determinationsvorgänge der späten Blattentwicklung eingreifen, während die hier untersuchten Veränderungen der Blattform ihre Ursachen in abgewandelten Vorgängen der frühen und mittleren Meristementwicklung finden.

4. *Die Entwicklung der Meristeme als Differenzierungsvorgang.* Bei der Morphogenese des Blattes sondern sich aus einheitlichen meristematischen Komplexen infolge ihrer Teilungstätigkeit neue Meristeme aus, die allein schon durch ihre Lage zu spezielleren Leistungen determiniert sind. Die verschiedenen Stadien der Meristementwicklung sind also Determinationsstufen zu spezifischeren Leistungen, die als wesentliches Prinzip bei der Morphogenese der Pflanzen angesehen werden können. Korrelationen, die unter den Meristemen bestehen, können verändert werden und führen zu Formänderungen der wachsenden Organe. So ist die hier untersuchte Schlitz- und Schmalblättrigkeit auf Veränderungen derartiger Korrelationssysteme zurückzuführen.

Diese Entwicklung der Spreitenmeristeme unter Berücksichtigung der Veränderungen, die durch die untersuchten Mutanten verursacht werden, ist im folgenden Schema zusammengefaßt, aus dem hervorgeht, daß die Entwicklung eines jeden mutativ veränderten Faktors nicht nur an einer Phase erkennbar ist, sondern daß jeder Hemmung der Entwicklung an einer Stellung eine Förderung an einer anderen Stelle entspricht (S. 525).

ausdifferenzierten, parenchymatösen und dem Leitbündel naheliegenden Zellen entsteht und kein marginales Meristem und kein ausgeprägtes Plattenmeristem hat. Ihm wohnen Ordnungstendenzen inne, die während der Entwicklung zu einem plattenmeristemähnlichen Aufbau der Zellen führen. Im wesentlichen nicht unterschieden ist der histologische Aufbau und die Größe der ausgewachsenen Blätter. Bei der Entwicklung der Blütenblätter fällt infolge Fehlens eines marginalen Meristems die Anlage der Blütenblattränder aus.

2. *Aesculus hippocastanum asplenifolia* unterscheidet sich von der Normalform durch eine vermehrte Ausbildung von Blattwirteln, Blättern und Blättchen. Jeder Wirtel besteht aus drei Blättern. Die Blattanlagen sind begrenzter und wachsen stärker in die Länge. Es wird kein zusammenhängender Spreitensaum angelegt. Nur an der Spitze finden sich Mesophyll und Seitennerven, später an der Basis nur Seitennerven. Die Histogenese ist nicht unterschieden. Die Schuppenblätter sind schmaler.

3. Bei der laciniaten Form von *Betula pendula* ist die erste Spreitenanlage auf die Seitennerven beschränkt. Die Entwicklung der Seitennervenanlagen ist zeitlich von der des Mesophylls getrennt und geht voran. Die Mittelrippe und die Seitennerven wachsen schneller und sind an ausgewachsenen Blättern länger. Die Histogenese ist nicht unterschieden.

4. *Corylus avellana laciniata* verhält sich sehr ähnlich wie die laciniata Form von *Betula pendula*. Die Verzögerung der Teilungstätigkeit des mesophyllliefernden Gewebes ist geringer als bei *Betula*.

5. Versuche mit Wuchs- und Hemmstoffen machen wahrscheinlich, daß die untersuchten Störungen in der Morphogenese früher auftreten als Wuchsstoffeffekte.

6. Es werden Korrelationssysteme während der Blattmorphogenese und ihre Veränderungen bei den Mutanten diskutiert.

Frau Prof. Dr. C. HARTE danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, das stete Interesse an ihrem Fortgang und mannigfache Förderung.

Literatur

- AVERY, G. S.: Structure and development of the tobacco leaf. *Amer. J. Bot.* **20**, 565—592 (1933). — Differential distribution of a phytohormon in the developing leaf of *Nicotiana* and its relation to polarized growth. *Bull. Torrey Bot. Club* **62**, 313—330 (1935). — BINDLOSS, E. A.: A developmental analysis of cell length as related to stem length. *Amer. J. Bot.* **29**, 179—198 (1942). — BONNER, D., and A. J. HAAGEN-SMIT: Leaf growth factors. II. The activity of pure substances in leaf growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **25**, 184—188 (1939). — BONNER, D., A. J. HAAGEN-SMIT u. F. W. WENT: Leaf growth factors. I. A bioassay and source for leaf growth factors. *Bot. Gaz.* **101**, 128—144 (1939). — BÜNNING, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin 1953. — BURTON, D. F.: Formative effects of certain substituted chlorophenoxy compounds on bean leaves. *Bot. Gaz.* **109**, 183—194 (1947). — FISHER, R. A., and F. YATES: Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Edinburgh u. London 1948. — FOSTER, A. S.: Leaf differentiation in Angiospermes. *Bot. Review* **2**, 349—372 (1936). — GIFFORD, E. M.: Effect of 2,4-D upon the development of the cotton leaf. *Hilgardia* **21**, 607—644 (1953). — GOEBEL, K.: Organographie der Pflanzen, Bd. I. Jena 1928. — HAMMOND, D.: The expression of genes for leaf shape in *Gossypium hirsutum* L. and *G. arboreum* L. I. The expression of genes for leaf shape in *Gossypium hirsutum* L. *Amer. J. Bot.* **28**, 124—138 (1941a). — The expression of genes for leaf shape in *Gossypium hirsutum* L. and *G. arboreum* L. II. The expression of genes for leaf shape in *Gossypium arboreum* L. *Amer. J. Bot.* **28**, 138—151

(1941b). — HEIDENHAIN, M.: Die Spaltungsgesetze der Blätter. Jena 1932. — HUXLEY, I. S.: Problems of relative growth. London 1932. — LOEWER, K.: *Tilia americana asplenifolia* var. *laciniata*. Jber. naturwiss. Ver. Kassel **41**, 24 (1896). — MATHER, K.: Statistical analysis in biology, 4. Aufl. London 1951. — McILLRATH, W. J., and D. R. EGGLE: Developmental stages of the cotton plant as related to the effect of 2,4-D. Bot. Gaz. **114**, 461—467 (1953a). — Further evidence of persistence of the 2,4-D stimulus in cotton. Plant Physiol. **28**, 693—702 (1953b). — McILLRATH, W. J., D. R. EGGLE, and A. A. DUNLAP: Persistence of the 2,4-D stimulus in cotton plants with reference to its transmission to the seed. Bot. Gaz. **112**, 511—518 (1951). — OEHLKERS, F.: Über Chromosomenfärbungen mit Gentianaviolett. Z. Bot. **36**, 55—62 (1940). — RENNER, O.: Zur Entwicklungsgeschichte randpanaschierter und reingrüner Blätter von *Sambucus*, *Veronica*, *Pelargonium*, *Spiraea*, *Chlorophytum*. Flora (Jena), N. F. **30**, 454—466 (1936). — ROTH, I., u. G. FAST: Über die Entstehung dorsaler Blattschläuche bei *Anthurium Scherzerianum* SCHOTT. Planta (Berl.) **44**, 543—561 (1954). — SCHÜEPP, O.: Meristeme, aus: K. LINSBAUER, Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. IV, I. Abt., Teil 2, Histologie. Berlin 1926. — SINNOT, E. W.: A factorial analysis of certain shape characters in squash fruits. Amer. Naturalist **61**, 333—344 (1927). — SINNOT, E. W., and S. KAISER: Two types of genetical control over the development of shape. Bull. Torrey Bot. Club **61**, 1—7 (1934). — WATSON, D. P.: An anatomical study of the modification of bean leaves as a result of treatment with 2,4-D. Amer. J. Bot. **35**, 543—555 (1948). — WENCK, U.: Die Wirkung von Wuchs- und Hemmstoffen auf die Blattform. Z. Bot. **40**, 33—51 (1952). — WENT, F. W.: Specific factors other than auxin affecting growth and root formation. Plant Physiol. **13**, 55—80 (1938). — The development of stems and leaves. Aus: F. SKOOG, Plant growth substances. Wisconsin 1951. — WENT, F. W., and K. V. THIMANN: Phytohormones. New York 1937. — WHALLEY, W. S., u. C. Y. WHALLEY: A developmental analysis of inherited leaf patterns in *Tropaeolum*. Amer. J. Bot. **29**, 195—200 (1942). — WHITTENBERGER, R. T., and J. NAGHSKI: Separation and mounting of leaf vein skeletons and epidermis. Amer. J. Bot. **35**, 719—722 (1948). — WINKLER, H.: *Solanum tubigenense*, ein echter Pfropfbastard zwischen Tomate und Nachtschatten. Ber. dtsh. bot. Ges. **26a**, 505—608 (1908). — ZIMMERMANN, P. W.: Formative influence of growth substances on plants. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **10**, 152—159 (1942).

Dr. HERMANN BERNHARD LÜCK, Institut für Entwicklungsphysiologie,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstraße 17

Aus dem Zoologisch-vergleichend-anatomischen Institut der Universität Zürich

FEHLEN VON ISOXANTHOPTERIN UND NICHT-AUTONOMIE IN DER
BILDUNG DER ROTEN AUGENPIGMENTE BEI EINER MUTANTE
(*ROSY*²) VON *DROSOPHILA MELANOGASTER**

Von

ERNST HADORN und ILSE SCHWINCK

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Januar 1956)

1. Einleitung

Es ist die Aufgabe der physiologischen Genetik, die biochemischen und entwicklungsphysiologischen Vorgänge zu analysieren, die vom Gen zum Erbmerkmal (Phän) führen. Der Experimentator wird dabei versuchen, mit irgendwelchen Mitteln in die Merkmalsbildung abändernd einzugreifen. Entscheidende Einsichten sind auch dann zu erwarten, wenn es gelingt, die beteiligten genspezifischen Stoffe abzufangen, zu ermitteln und wenn möglich anderen Genotypen zuzuführen. Diese Arbeit wird aber — mindestens bei höheren Organismen — dadurch erschwert, daß die Merkmalsbildung meist zellautonom erfolgt. Es ist daher nur ausnahmsweise möglich, in einem Zellbereich durch Stoffzufuhr von außen eine Merkmalsbildung auszulösen, die nicht der genetischen Konstitution der merkmalsbildenden Zellen entspricht.

Für die braunen Augenpigmente der Insekten (Ommochrome) konnte diese Schwierigkeit teilweise und nur deshalb überwunden werden, weil es einzelne Mutanten gibt, die sich als Transplantate oder gegenüber direkter Stoffzufuhr nicht-autonom verhalten. Bei *Drosophila melanogaster* sind es die von BEADLE und EPHRUSSI (1936) sehr eingehend untersuchten Genotypen *vermilion* (*v*) und *cinnabar* (*cn*). Entsprechend verhalten sich die rotäugige *a*-Mutante der Mehlmotte *Ephestia kühniella* (KÜHN 1932, 1936; CASPARI 1933), die *orange*-Mutante der Schlupfwespe *Habrobracon juglandis* (WHITING 1934, BEADLE, ANDERSON und MAXWELL 1938), die *white*-Mutante des Seidenspinners *Bombyx mori* (MOROHOSI 1938, KIKKAWA 1941) und die Genotypen *snow* (*s*) und *ivory* (*i*) der Honigbiene *Apis mellifica* (GREEN 1955). Die biochemische und entwicklungsphysiologische Analyse konnte zeigen, daß es sich bei all diesen Genotypen um Mutationszustände handelt, die eine für die Ommochrombildung unerläßliche Umwandlung von Tryptophan zu Kynurenin oder von Kynurenin zu 3-Oxy-Kynurenin nicht durchführen können (vgl. BUTENANDT 1953).

Im allgemeinen aber sind solche „experimentell zugängliche“ Mutationen recht selten. Die große Mehrzahl unter den zahlreichen Augenfarbgenotypen der *Drosophila* verhält sich autonom. Sodann wurden bis jetzt nur Mutanten bekannt und genauer untersucht, die eine Nicht-Autonomie in der Bildung der braunen Augenpigmente manifestieren. Nun enthält aber das Wildauge von

* Herrn Professor Dr. KARL V. FRISCH zum 70. Geburtstag gewidmet. — Ausgeführt mit Unterstützung der Karl-Hescheler-Stiftung.

Drosophila außer diesen Ommochromen noch die wasserlöslichen roten Augenpigmente. Auch diese Farbstoffe werden durch zahlreiche Genmutationen betroffen (MAINX 1938, EPHRUSSI 1942, CLANCY 1942, HADORN und MITCHELL 1951, NOLTE 1952, HADORN 1954a). Über die an der Synthese der roten Pigmente beteiligten biochemischen und genphysiologischen Vorgänge weiß man noch nichts. Die bisher untersuchten, am Rot angreifenden Genotypen ließen sich nicht beeinflussen; sie verhielten sich autonom.

Im folgenden können wir über eine Mutante (*rosy*²) berichten, die deshalb ein besonderes Interesse und ein eingehendes Studium verdient, weil bei diesem Genotypus in bezug auf Bildungsmenge des roten Augenpigmentes keine Zellautonomie besteht. Damit ergeben sich neue Möglichkeiten für eine biochemische und genphysiologische Analyse. Die Mutante manifestiert sodann noch ein weiteres biochemisch bemerkenswertes Phän: Es fehlt ihr das Isoxanthopterin, ein Stoff, der bei allen übrigen bisher von uns untersuchten *Drosophila*-Mutanten gefunden wurde (S. 531) und der überdies bei Arthropoden weit verbreitet ist. Daß außerdem auch noch eine Nicht-Autonomie für die Bildung oder Speicherung von Isoxanthopterin nachgewiesen werden konnte, erhöht den „analytischen Wert“ des mutierten Genotypus. Schließlich dürfte die isoxanthopterinlose Mutante auch geeignet sein, Aufschlüsse über Beziehungen zwischen Pterinen und den Augenpigmenten zu vermitteln. In einer ersten kurzen Mitteilung haben wir bereits über einige Ergebnisse berichtet, die für die *ry*²-Mutante charakteristisch sind (HADORN und SCHWINCK 1956).

2. Die genetischen Grundlagen

Unter den Nachkommen einer Kreuzung zwischen einem Wildstamm und einem seit Jahren in unserem Laboratorium gehaltenen *cn bw*-Stamm traten einzelne Fliegen mit orange-farbigen Augen auf. Sie ließen sich rein weiterzüchten. Eine erste papierchromatographische Untersuchung zeigte, daß sich in den „orange“-Tieren kein Isoxanthopterin nachweisen läßt und daß die roten Augenpigmente sehr stark vermindert sind. Durch geeignete Kreuzungsverfahren stellten wir zunächst fest, daß die orange Farbe bifaktoriell bedingt ist und daß sie zustande kommt durch das Zusammenwirken von *cn* (oder *v*) mit einer Mutation des 3. Chromosoms, die in unserem *cn bw*-Stamm aufgetreten ist (vgl. Tabelle 1, S. 532).

Für sich allein, d. h. ohne *cn* oder *v*, manifestiert sich die Mutation in einer rotbraunen Augenfarbe. Zur Lokalisation verwendeten wir dominante Markierer des 3. Chromosoms. Ein erstes Crossingover-Experiment wurde mit einem *D Sb*-Stamm angesetzt (*D* = *Dichaete*; Locus 3—40,4-41 ± und *Sb* = *Stubble*; Locus 3—58,2). Dabei ergaben sich für die „rotbraune“ Mutante folgende Rekombinationswerte: mit *D* = 12,4% (238:1921) und mit *Sb* = 9,1% (174:1921). Der gesuchte Locus muß zwischen *D* und *Sb* liegen, und zwar näher bei *Sb*. Zu einer genaueren Bestimmung wurde dann ein *Ly Sb*-Stamm verwendet (*Ly* = *Lyra*; Locus 3—40,5). Wir stellten folgende Rekombinationswerte fest: *Lyra* — „rotbraun“ = 10,1 ± 0,67% (201:1981) und „rotbraun“ — *Stubble* = 6,2 ± 0,54% (122:1981). Als approximativer Locus kann für „rotbraun“ der chromosomale Abschnitt 51 ± 1 des 3. Chromosoms gelten. Eine genauere Bestimmung stößt wegen der herabgesetzten Vitalität der Homozygoten (S. 533) auf Schwierigkeiten.

Um allfällige Identitäten oder Allelien mit bereits bekannten Augenfarbgenen festzustellen, kreuzten wir unser „rotbraun“ mit folgenden Mutanten des 3. Chromosoms)¹: *rs*², *st*, *p*, *p*^v, *ma*, *ry*, *kar*², *sed*, *cd*, *mah* und *ca*. Mit einer Ausnahme (*ry* — *rosy*) zeigten alle F₁-Bastarde wildfarbige Augen, und sie lieferten auch das für den Wildtyp charakteristische Inventar an fluoreszierenden Stoffen. Nur über *ry* manifestierte sich „rotbraun“. Der Compound war weder in der Augenfarbe noch im Fluoreszenzmuster von „rotbraun“ zu unterscheiden. Es fehlte also auch das Isoxanthopterin. Zwischen dem *rosy*- und „rotbraun“-Stamm ergaben sich, mindestens vorläufig, auch keine weiteren Unterschiede. Zudem lieferten auch die *inter se*-Nachzuchten des Compounds nur „rotbraune“ Individuen.

Rosy (*ry*) ist eine wenig bekannte Mutante, die BRIDGES im Jahre 1938 entdeckt hat (vgl. BRIDGES und BREHME 1944). Die Augenfarbe wird mit „deep ruby“ bezeichnet. Der *ry*-Stamm, der uns zur Verfügung stand, zeigte, wie bereits erwähnt, die gleiche dunkelbraune Augenfarbe wie unser „rotbraun“. BRIDGES gibt für *rosy* den Locus 3—51 ± an. Somit besteht im Rahmen der möglichen Präzision volle Übereinstimmung mit dem Locus, den wir für „rotbraun“ fanden. Nach den Prioritätsregeln ist unsere Mutante als *rosy*² (Symbol *ry*²) zu bezeichnen. Eingehende quantitative Studien des Stoffinventars könnten erst zeigen, ob zwischen *ry* und *ry*² Manifestationsunterschiede bestehen.

Der „rotbraune“ Stamm wird nun in der nachfolgenden Darstellung als *ry*²-Stamm bezeichnet. Für zahlreiche Experimente verwendeten wir den bifaktoriellen „orange“-Stamm, dem die genetische Konstitution *cn cn; ry*² *ry*² zukommt. Eine orange Augenfarbe ergibt sich auch bei *v/v; ry*²/*ry*²- oder *v/v; cn/cn; ry*²/*ry*²-Tieren.

3. Das pleiotrope Manifestationsmuster von *rosy*²

Alle nachfolgenden Angaben gelten für Tiere, die bei 25 ± 0,5° C gehalten und auf Standardfutter (Mais-Zucker-Hefe-Agar) gezüchtet wurden. Mit den festgestellten Phänen ist wahrscheinlich die Mannigfaltigkeit des pleiotropen Wirkungsmusters nicht vollständig erfaßt. Eine eingehende Untersuchung dürfte noch weitere biochemische und entwicklungsphysiologische Merkmale aufdecken, die für *rosy*² charakteristisch sind.

a) **Die sichtbaren Pigmente.** Das *Facettenauge* von *rosy*² ist deshalb rotbraun, weil viel weniger rotes Pigment gebildet wird als beim Wildtyp. Über das Ausmaß dieser Reduktion geben die Abb. 2 und 3 und die Tabellen 5 und 6 Auskunft. Dabei kommt die durch *ry*² nicht betroffene braune Ommochrom-Komponente phänotypisch stärker zur Geltung. Fallen durch die Wirkung der *cn*-Gene (oder *v*-Gene) die Ommochrome aus, so erscheint das *cn/cn; ry*²/*ry*²-Auge hell orangefarbig, was wiederum auf die *ry*²-bedingte Reduktion der roten Pigmente beruht.

Die *Ocellen* sind bei *ry*² bräunlich wie beim Wildtyp.

Die *Hodenfarbe* ist vom Wildtyp kaum verschieden; sie erreicht bei *ry*² einen annähernd ebenso intensiven Gelbton wie bei +.

Die MALPIGHISCHEN *Gefäße* sind bei *ry*²-Larven weniger intensiv gelb gefärbt als beim Wildtyp. Auch BREHME und DEMEREC (1942) geben für *ry* eine schwierig zu klassifizierende Pigmentverminderung an.

¹ Wir danken Dr. E. B. LEWIS, Pasadena, herzlich für die Überlassung von Stämmen.

b) Zum Inventar der Fluoreszenzstoffe. Das Fehlen von Isoxanthopterin charakterisiert die ry^2 -Mutante in besonders spezifischer Weise (HADORN und SCHWINCK 1956). Dieser Befund ist vor allem deshalb bemerkenswert, weil alle übrigen von HADORN und MITCHELL (1951) und von uns mit papierchromatographischen Methoden untersuchten Genotypen von *Drosophila melanogaster* das Isoxanthopterin bilden. Dies gilt für die folgenden Mutationszustände: +, *b*, *bw*, *ca*, *car*, *cd*, *cl*, *cn*, *e*, g^2 , kar^2 , *ltd*, *lt*, le^{cl} , *ma*, *mah*, *p*, p^u , pn^2 , *pr*, rs^2 , *se*, *sed*, *st*, *v*, *w*, w^a , w^c , *y*. Allerdings verschwindet das Isoxanthopterin bei einzelnen Mutanten während der ersten Imaginaltage aus dem Körper der Fliegen. Ein solches nur transitorisches Vorkommen wurde für *w* (*white*) und *bw* (*brown*) nachgewiesen und fluorometrisch verfolgt (HADORN 1954b). Auf Grund der an *w* und *bw* gewonnenen Erfahrungen prüften wir die ontogenetischen Veränderungen im Fluoreszenzinventar von ry^2 besonders sorgfältig. Wir fanden aber in keinen Larven-, Puppen- oder Imaginalstadien je eine Spur dieses Stoffes. So sind bei ry^2 namentlich auch die Hoden, die bei allen übrigen Genotypen das Isoxanthopterin in der relativ höchsten Konzentration enthalten, völlig frei davon.

Die für ry^2 charakteristische Reduktion der orange-gelb fluoreszierenden roten Augenpigmente wurde bereits erwähnt (S. 530). Mit dieser Minderleistung werden wir uns im folgenden eingehend befassen.

Der Ausfall von Isoxanthopterin und die Reduktion der roten Pigmente erscheint bei ry^2 kompensiert oder korreliert mit einer ausgiebigen Verstärkung anderer fluoreszierender Stoffe. Es handelt sich um die Verbindungen, die von HADORN und MITCHELL (1951) mit „Fl. 4/5“ bezeichnet wurden (vgl. FORREST und MITCHELL 1954 a, b, 1955, sowie VISCONTINI und Mitarbeiter 1955a, b, c). Nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse enthält diese Fl. 4/5-Gruppe folgende Stoffe: 1. Riboflavin; 2. 2-Amino-6-oxy-pterin (HB_1); 3. HB_2 , ein Pterin, dessen Konstitution noch nicht im einzelnen feststeht; 4. ein gelbes Pigment, das bei der *sepia*-Mutante stark angereichert ist (2-Amino-6-oxy-10-N-lactyl-pterin-8-carbonsäure nach FORREST und MITCHELL). Diese Stoffe zerfallen alle mehr oder weniger schnell bei Belichtung. Dabei entsteht u. a. eine 2-Amino-6-oxy-pterin-8-carbonsäure (HB_3).

Bei ry^2 ist zunächst die Substanzmenge im 4/5-Fleck im Vergleich zum normalen Wildtyp stark vermehrt. Welche der vier genannten Stoffe an dieser Vermehrung beteiligt sind, steht noch nicht fest. Außerdem tritt in belichteten ry^2 -Chromatogrammen auch die Pterincarbonsäure (HB_3) in Quantitäten auf, die weit über der bei +-Chromatogrammen festgestellten Konzentration liegen.

c) Anomalien in den MALPIGHISCHEN Gefäßen. Die MALPIGHISCHEN Gefäße der Imagines erscheinen stets unregelmäßig geformt und auch verkürzt. Einzelne Stellen sind stark aufgebläht. Im Lumen finden sich große Kugeln und Kugelaggregate eines gelb bis orange gefärbten Exkretmaterials. Diese charakteristischen Stoffwechselprodukte bilden sich schon bei Larven des 1. Stadiums, sie konnten sogar bei Präparation von schlüpfreifen Larven noch innerhalb der Eihüllen gefunden werden. Während des ganzen Larvenlebens finden sich diese Kugeln und Kugelaggregate in ungleichmäßiger Menge und wechselnder Lage in den MALPIGHISCHEN Gefäßen und seltener im Enddarm. Sie sind besonders reich bei alten Puppen und schlüpfenden Imagines vertreten. Die Exkretbrocken werden in den Enddarm abgegeben und nach außen entleert. In den

MALPIGHISCHEN Gefäßen älterer Fliegen finden wir diese gefärbten Einschlüsse in individuell sehr unterschiedlicher Menge, was wahrscheinlich auf einer nicht kontinuierlichen Entleerung beruht. Eine spezielle Untersuchung müßte zeigen, ob hier eine Anomalie des Exkretstoffwechsels vorliegt, die mit den für ry^2 charakteristischen Pigmentierungsphänomenen zusammenhängt.

d) Die herabgesetzte Vitalität. Bei den zahlreichen Auskreuzungen, die wir zur Untersuchung der genetischen Grundlagen (S. 529) benötigten, ergaben sich ausnahmslos für die Mendelklassen der „rotbraunen“ ry^2/ry^2 -Fliegen wie auch der „orangefarbig“ $cn/cn; ry^2/ry^2$ -Tiere herabgesetzte Aufwachsanzahlen. Die Aufspaltungsverhältnisse und Vitalitätsprozente der in Tabelle 1 aufgeführten Experimente können als charakteristische Beispiele gelten. Bei den beiden ersten Kreuzungen (I, II) haben wir die Vitalität der $rosy^2$ - und der „orange“-Klasse auf die Aufwachsanzahlen der Wildtyp-Geschwisterschaften bezogen, die mit 100% eingesetzt wurden. Dabei ergeben sich für unsere Mutante Durchschnittswerte

Tabelle 1. Auskreuzungsergebnisse und relative Vitalität für ry^2/ry^2 und „orange“ ($cn/cn; ry^2/ry^2$) bei 25° C. *N* Zahl der Nachkommen, *n* Zahl der Einzelpaarzuchten

Experiment	<i>N</i>	<i>n</i>	Ergebnis und (Erwartung) in Prozent von <i>N</i>				Relative Vitalität (in %) für	
			wild	<i>cinnabar</i>	<i>rosy^2</i>	„orange“	<i>rosy^2</i>	„orange“
I. $cn/+; ry^2/+ \times cn/+; ry^2/+$	4392	17	69 (56)	14 (19)	12,5 (19)	4,5 (6)	53	57
II. $cn/+; ry^2/+ \times cn/cn; ry^2/ry^2$	2542	15	28 (25)	26,5 (25)	23,5 (25)	22 (25)	88	78
III. $cn/cn; ry^2/+ \times cn/cn; ry^2/+$	2338	15	—	85 (75)	—	15 (25)	—	52
IV. $cn/cn; ry^2/+ \times cn/cn; ry^2/ry^2$	2489	17	—	59 (50)	—	41 (50)	—	68

von relativen Vitalitäten, die über einen weiten Bereich (53—88%) verteilt sind. Diese Streuung wird zum Teil darauf beruhen, daß die Bezugsklasse „wild“ selbst uneinheitlich und zudem bei I und II verschieden ist. Im Experiment I sind unter „wild“ folgende vier Genotypen vertreten: $+/+; +/+$, $+/cn; +/+$, $+/+; +/ry^2$ und $+/cn; +/ry^2$. Im Experiment II haben dagegen alle „wild“-Fliegen den Genotypus $+/cn; +/ry^2$. Für die Aufspaltungen der Experimente III und IV wurde die Vitalität auf die *cinnabar*-Klasse ($cn/cn; +/ry^2$ bzw. $cn/cn; +/+$ für III und $cn/cn; ry^2/+$ für IV) bezogen.

Genauere Aufschlüsse über die reduzierte Vitalität der für ry^2 homozygoten Individuen ließen sich nur durch direkte Kontrolle des ganzen Entwicklungsablaufes von reinen ry^2/ry^2 - und $cn/cn; ry^2/ry^2$ -Zuchten gewinnen. Dabei untersuchten wir, in welchem Stadium die ry^2 -bedingte Sterblichkeit einsetzt.

Die embryonale Sterblichkeit. Die Fliegen wurden in Einzelpaaren gehalten. Die Weibchen konnten ihre Eier auf eine schwarze mit Tierkohle versetzte Futteroberfläche ablegen. Die Tagesgelege der einzelnen Weibchen wurden ausgezählt, und nach 24 und 48 Std bestimmten wir sowohl die Zahl der leeren Eihüllen, wie auch die Zahl der nicht geschlüpften Eier. Es wurden je Paar 2—4 Tagesgelege geprüft. Wir beschränkten uns dabei auf 24 Std-Gelege, die von 5—10 Tage alten Elterntieren stammen. Es ist bekannt, daß in diesem Lebensabschnitt noch

Tabelle 2. *Schlüpfraten der Tagesgelege von Einzelpaaren*

Genotypus	Zahl der				Mittlere Schlüpf-rate	Extremwerte	
	Einzel-paare	Tages-gelege	Eier total	Eier je Tag (Mittel)		Min.	Max.
$+/+; ry^2/ry^2$	8	14	606	43	87%	78%	95%
$cn/cn; ry^2/ry^2$	9	26	996	38	91%	74%	100%
$+/+; +/+$ (Sevelen)	8	14	1024	73	68%	56%	74%

kein durch zunehmendes Mutteralter bedingter Fekunditäts- und Fertilitätsabfall eingesetzt hat (HADORN und ZELLER 1943, REIFF 1945). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Wir stellten fest, daß die ry^2 -Mutation keine zusätzliche Embryonalsterblichkeit bedingt. Die Schlüpfraten der beiden geprüften Stämme sind sogar ausgesprochen gut und erreichen das Niveau eines hochfertilen Wildstammes (vgl. REIFF 1945). Bei zwei Zuchtpaaren des „orange“-Stammes betrug die Schlüpf-rate für 3 bzw. 4 aufeinanderfolgende Tagesgelege durchwegs 100%. Dabei wurden 124 bzw. 102 Eier abgelegt. Im Vergleich zu den hohen Werten der ry^2 -Stämme liegt die Schlüpf-rate bei einem mit gleicher Methode und parallel geprüften Labor-Wildstamm (Sevelen) viel tiefer. Offensichtlich handelt es sich hier um eine der Minusvarianten, wie sie bei „Wildstämmen“ recht häufig festzustellen sind.

Ein ungünstiger Einfluß des ry^2 -Faktors macht sich dagegen in der *Eiproduktion* bemerkbar. Die mittlere Tagesfekundität der verschiedenen geprüften Weibchen (Eier je Tag) liegt deutlich unter der für Wildstämmen geltenden Norm (Tabelle 2).

Das Ausmaß der larvalen, pupalen und frühimaginealen Sterblichkeit prüften wir auf folgende Weise: Je 100 frisch geschlüpfte „Eilärven“ (I. Stadium) wurden in eine Futterschale von 8 cm Durchmesser umgesetzt. Je Genotypus untersuchten wir 10 solche Kulturen, so daß die Aufwachsahlen für je 1000 Individuen bestimmt werden konnten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengestellt, und in der Abb. 1 sind die weitgehend homogen streuenden Werte der Einzelkulturen angegeben.

Tabelle 3. *Bestimmung der larvalen und pupalen Letalität, sowie des frühimaginealen Vitalitätszustandes*

Genotypus	Ei-larven	Puppen	Larvale Letalität	Letale Puppen	Halb geschlüpfte Imagines	Schwache Imagines	Normale Imagines	
							Anzahl	in % der Puppen
$+/+; ry^2/ry^2$. .	1000	918	8,2%	293	33	308	284	31%
$cn/cn; ry^2/ry^2$. .	1000	908	9,2%	345	23	274	266	29%
$+/+; +/+$. . . (Sevelen)	1000	843	15,7%	46	—	—	797	95%

Wir finden zunächst, daß ry^2 keine larvale Letalität bedingt. Die Zahlen der verpuppten Individuen liegen für die beiden ry^2 -Stämme durchschnittlich sogar höher als für den mit gleicher Methodik geprüften Wildstamm. Mit einer „residualen“ Larvensterblichkeit von 5—15% hat man ohnehin auch bei normalen Stämmen zu rechnen (HADORN und CHEN 1952).

Eine für ry^2 charakteristische Entwicklungsschwäche manifestiert sich erst in der Endphase der Metamorphose. In beiden ry^2 -Stämmen entwickeln sich alle verpuppten Tiere zwar noch zu ausgefärbten, scheinbar schlüpfreifen Fliegen; doch sind rund ein Drittel davon nicht fähig, das Puparium zu verlassen (in Tabelle 3 als „letale Puppen“ registriert). Eine weitere, in geringeren Prozentsätzen auftretende Kategorie („halbgeschlüpfte Imagines“, Tabelle 3) sprengt zwar noch das Puparium, kann aber den Schlüpfakt nicht erfolgreich beenden. Auch unter den geschlüpften Tieren (Abb. 1, gJ) befinden sich sehr viele „schwache Imagines“, die sich nur mühsam bewegen, am Futter kleben bleiben und nicht

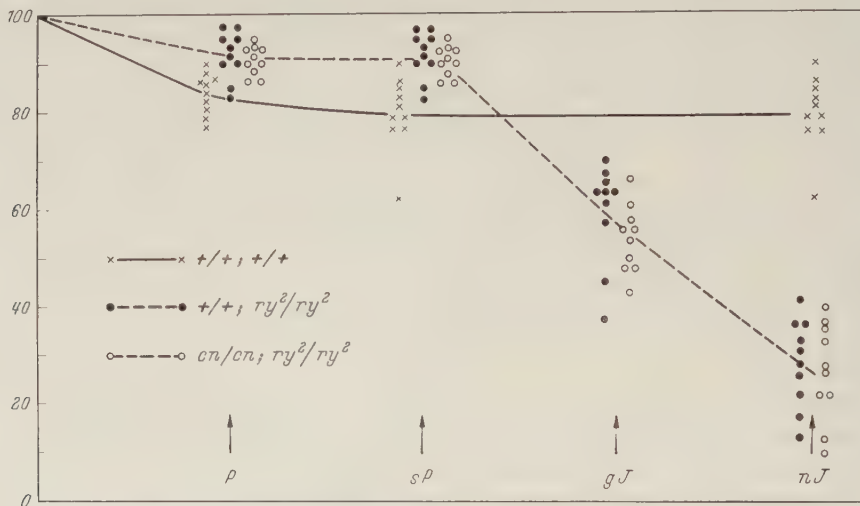


Abb. 1. Überlebenskurven (Mittelwerte) und Streuung der Einzelzuchten mit je 100 eingesetzten Eilärchen; P Anzahl der gebildeten Puparien; sP Anzahl der schlüpfreifen Puppen (ausgefärbte Imagines); gJ Anzahl der geschlüpften Imagines; nJ normale Imagines nach Abzug der „schwachen Imagines“

lange überleben. Nur rund 30% der verpuppten Tiere entwickeln sich zu „normalen Imagines“, d. h. sie überleben den 2. Tag und erreichen damit das Stadium der Fortpflanzungsfähigkeit.

Somit bewirkt der ry^2 -Faktor unter den gegebenen Umweltbedingungen (25° C, normales und reichliches Futter) eine charakteristische „Semiletalität“. Im einzelnen handelt es sich um eine *monophasische Spätwirkung*, die beim Grenzübergang von der Endpuppe zur Frühimago manifest wird (vgl. HADORN 1955). Zwischen dem $cn/cn; ry^2/ry^2$ - und dem $+/+; ry^2/ry^2$ -Stamm konnten keine Vitalitätsunterschiede festgestellt werden (Abb. 1, gemeinsame Mittelwertskurve).

In den Kontrollzuchten des Wildstammes (Sevelen) ist die pupale Sterblichkeit erwartungsgemäß gering. Von den 843 puparierten Tieren entwickeln sich 797 (94,5%) zu normalen Imagines. Die ausfallenden Individuen gehen meist schon im Vorpuppenstadium zugrunde. Ausgefärbte letale Puppen und „schwache Imagines“ wurden nicht beobachtet. Diese Befunde beweisen, daß unsere Zuchtbedingungen günstig waren und damit ist auch gezeigt, daß die Semiletalität der ry^2 -Stämme genetisch bedingt ist.

4. Der Grundversuch: „Förderung und Hemmung“ der roten Augenpigmente in Transplantaten und durch Transplantate

a) Methodik. In Larven des 3. Stadiums wurde je eine Augenimaginalscheibe implantiert. Zwischen Spender und Wirt bestanden nur geringe oder keine Altersunterschiede; beide hatten jedenfalls die zweite Hälfte des letzten Larvenstadiums erreicht. 5–6 Tage nach dem Schlüpfen seziierten wir die Imagines. Die im Abdomen liegenden Augenimplantate wurden freipräpariert, dann sofort einzeln auf Chromatographiepapier übertragen und auf den Startflecken zerrieben. Neben jedem Implantat wurde je ein Auge des Wirtes aufgetragen. Die eindimensionalen Chromatogramme entwickelten wir in Propanol-Ammoniak (2:1, aufsteigend). Die hellroten Augenpigmente erreichen dabei R_f -Werte von 0,04–0,06. Sie entsprechen der von HADORN und MITCHELL (1951) als „Fl 1“ bezeichneten Stoffgruppe. Wie laufende Untersuchungen zeigen, enthält diese Stoffgruppe 3 Produkte, die im sichtbaren wie auch im Fluoreszenzlicht teils gelborange, teils orangerot erscheinen. Alle Angaben der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die Gesamtheit dieser Fl 1-Stoffe. Die fluoreszierenden *Drosophilastoffe* werden im Lichte mehr oder weniger verändert oder zerstört. Wir chromatographierten daher im Dunkeln und schützten auch die entwickelten Papiere vor Licht. Dagegen erfolgte das Auftragen der Organe bei Zimmerbeleuchtung.

Ein Maß für die Quantität der hellroten Augenpigmente liefert uns die Intensität des Fluoreszenzlichtes, das von einem Chromatographieflecken ausgeht. Ein *Drosophila*-Auge ergibt genügend Material, so daß die relative Stoffmenge eines jeden Implantates gemessen und mit der Stoffmenge des dazugehörigen Wirtsauges oder den Augen anderer Versuchstiere verglichen werden kann. Die Fluoreszenzintensität wurde nach einem Verfahren gemessen, wie es zuerst HADORN und KÜHN (1953) verwendeten. Dabei werden die im langwelligen UV-Licht fluoreszierenden Flecken aus dem Chromatogramm herausgeschnitten und direkt in den Strahlengang einer Apparatur gebracht, die nur das emittierte Fluoreszenzlicht auf eine Photozelle fallen läßt. Die nach Abzug der Papierblindwerte resultierenden Galvanometerablesungen sind auf den Ordinaten der Abb. 2 aufgetragen und in der Tabelle 5 angegeben. Arbeitet man aufsteigend mit eindimensionalen „Zipfelchromatogrammen“, die mit 7 mm breiten Streifen eintauchen, und läßt man das Lösungsmittel während 14–16 Std bis zu einer Höhe von 25–27 cm steigen, so lassen sich die roten Pigmente auf Papierausschnitten von 1,5 bis 2 cm² Flächengröße messen. Die mit der Galvanometerablesung erfaßte Fluoreszenzintensität steigt dann annähernd linear mit der aufgetragenen Stoffmenge an. Sehr viel kleinere, kompaktere Flecken ergeben dagegen keine linearen Fluoreszenzwerte.

b) Die sichtbare Augenfarbe. Für die Transplantationen verwendeten wir einen „orange“-Stamm des Genotypus $cn/cn; ry^2/ry^2$, der auch noch den v -Faktor enthielt. Die Augenfarbe variiert hier von einem hellen Orangegelb bis zu einem dunkeln Gelborange. Die reziproken Transplantationen wurden mit einem Wildstamm „Sevelen“ (+) und mit den Mutanten cn , v und w^av durchgeführt. Die Inspektion der seziierten Augenimplantate zeigte einen überraschenden Doppelbefund: *Einerseits erreichen im Wildgenotypus die implantierten $cn/cn; ry^2/ry^2$ -Augen annähernd bis völlig die Augenfarbe der Wildform und andererseits unterbleibt*

im $cn/cn; ry^2/ry^2$ -Wirt die dem Genotypus des Implantates entsprechende Ausfärbung, indem z. B. die $+$ -Implantate nur die Dunkelorangestufe erreichen. Somit verhält sich die Augenfarbe der Transplantate in beiden Fällen nicht-autonom. In der Tabelle 4 sind die beobachteten Augenfarben der reziproken Transplantationen eingetragen. Eine Beeinflussung der „orange“-Augen der $cn/cn; ry^2/ry^2$ -Wirt durch $+$, cn - oder v -Implantate war dagegen bei äußerer Beobachtung nicht eindeutig festzustellen; genauere Befunde können erst die im folgenden Abschnitt beschriebenen quantitativen Bestimmungen geben.

Tabelle 4. Beobachtete Augenfarben bei reziproken Transplantationen
Die Nummern (5)–(12) verweisen auf die Abb. 2, wo die quantitativen Befunde dargestellt sind.

Wirt		Implantat	
Genotypus	Augenfarbe	Genotypus	Augenfarbe
$+/+; +/+$ (5)	dunkel wildrot	$cn/cn; ry^2/ry^2$	annähernd wildrot
$cn/cn; ry^2/ry^2$ (9)	orange	$+/+; +/+$	dunkel orange
$v/v; +/+$ (6)	hellrot	$cn/cn; ry^2/ry^2$	hellrot
* $cn/cn; ry^2/ry^2$ (10)	orange	$v/v; +/+$	orange
$cn/cn; +/+$ (7)	hellrot	$cn/cn; ry^2/ry^2$	hellrot
$cn/cn; ry^2/ry^2$ (11)	orange	$cn/cn; +/+$	orange
$w^av/w^av; +/+$ (8)	weißlich	$cn/cn; ry^2/ry^2$	hellrot
* $cn/cn; ry^2/ry^2$ (12)	orange	$w^av/w^av; +/+$	weißlich

* Die verwendeten Tiere des „orange“-Stammes enthielten überall auch noch den v -Faktor, hatten also die Konstitution $v/v; cn/cn; ry^2/ry^2$.

e) Die Quantität der hellroten Augenpigmente bei Wirt und Implantat. α) Vergleich: Wirtsaugae — Implantatsaugae. Nach allgemeiner Erfahrung werden die larval implantierten Augenanlagen im Innern des Abdomens nicht so groß wie die Augen des Wirtes. Dies mag zunächst darauf beruhen, daß implantierte Imaginalscheiben nicht ausgestülpt werden und sich daher zu invertierten Blasen entwickeln, bei denen die Facettenaußenfläche nach innen gerichtet ist. Unsere Messungen zeigen nun, daß die Implantatsaugen nicht nur volumenmäßig unternormal sind, sondern auch bedeutend weniger rote Augenpigmente enthalten als die Wirtsaugen. In der Abb. 2, Experimente 1–4, sind die Fluoreszenzwerte der Implantatsaugen zusammen mit ihren zugehörigen Wirtsaugen aufgetragen. Wir sehen, daß ein Wirtsaugae durchschnittlich 1,5–2mal soviel rote Pigmente enthält als das Implantat. Für die weiblichen Wirtsaugen ergeben sich, infolge ihres größeren Volumens, meist etwas höhere Werte als für männliche Augen. Das „Geschlecht“ der implantierten Imaginalscheiben haben wir nicht berücksichtigt. Es dürften etwa gleich viel weibliche wie männliche Scheiben verwendet worden sein. Wahrscheinlich ist für die Pigmentbildung nur maßgebend, ob ein Implantat in einem großen weiblichen oder in einem kleinen männlichen Wirt aufwächst. Die Meßwerte der Implantate eines weiblichen Wirtes scheinen durchschnittlich in fast allen Versuchsgruppen höher zu liegen als die Implantate aus Männchen. Doch müßte diese Feststellung noch an einem größeren und einheitlichen Material bestätigt werden.

β) Vergleich der Genotypen (Abb. 2, Exper. 1–4). Ob in der Menge der roten Augenpigmente zwischen dem verwendeten Wildstamm „Sevelen“ ($+$; Exper. 1)

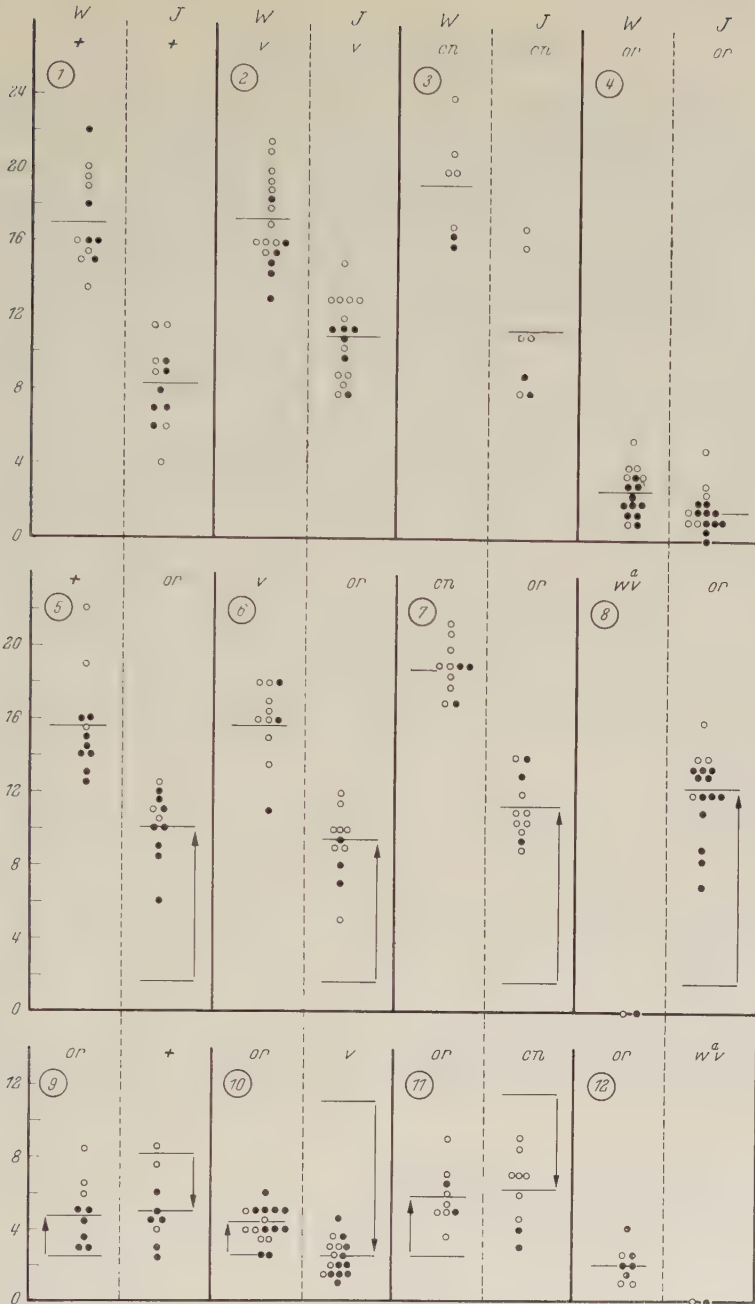


Abb. 2. Meßwerte (Ordinaten) zur Quantität der roten Augenpigmente im Wirtsauge (*W*, je linke Gruppe) und im Implantatsauge (*I*, je rechte Gruppe) für 12 verschiedene Experimentalserien. Auf der Wirtsseite bezeichnen die offenen Kreise die Meßwerte einzelner Augen von Weibchen, die ausgefüllten Kreise die Meßwerte für männliche Augen. Auf der Implantatseite bezeichnen die entsprechenden Symbole nicht das „Geschlecht“ des Implantatsauges, sondern dasjenige des Wirtes (offene Kreise: weibliche Wirt; ausgefüllte Kreise: männliche Wirt). Die Mittelwerte der einzelnen Meßgruppen sind durch waagrechte Striche bezeichnet. Die nach oben gerichteten Pfeile der Experimente 5—8 geben an, um wieviel durchschnittlich der Meßwert eines „orange“-Implantates im betreffenden Wirt über das Niveau der Kontrollimplantate (waagrechtlicher Strich rechts im Exper. 4) ansteigt. Die abwärts gerichteten Pfeile der Experimente 9—11 zeigen an, um wieviel der Meßwert eines Implantates der Spender +, *v* und *cn* im „orange“-Wirt unter das für den betreffenden Genotypus normale Implantatsniveau (waagrechte Striche je rechts in den Exper. 1—3) absinkt. Die kurzen aufsteigenden Pfeile der Experimente 9—11 deuten auf eine Erhöhung der „orange“-Pigmentproduktion in den Augen von *cn/cn*; *ry*²/*ry*²-Wirten hin, die +, *v* oder *cn*-Implantate enthalten.

und den Mutanten *vermilion* (*v*; Exper. 2) und *cinnabar* (*cn*; Exper. 3) gesicherte Unterschiede bestehen, läßt sich auf Grund des vorliegenden Materials nicht entscheiden. Dagegen zeigen unsere Messungen (Exper. 4), daß der „orange“-Stamm (*cn/cn*; *ry²/ry²*) nur sehr wenig rote Pigmente bildet. In den Augen von $+$, *cn* und *v* dürften rund 10mal soviel rote Pigmente vorhanden sein als bei „orange“. Bei der Kombination von Exper. 4 vermindert sich übrigens die Pigmentmenge des Implantates gegenüber derjenigen des Wirtes in gleichem Ausmaße wie bei Exper. 1—3. Beim Genotypus *w^vv* (*white-apricot*, *vermilion*), der in den Exper. 8 und 12 Verwendung fand, konnte kein rotes Augenpigment festgestellt werden, und bei der Kombination *w^vv*-Implantat in *w^vv*-Wirt wurde erwartungsgemäß auch kein rotes Pigment gebildet.

γ) *Förderung der Pigmentbildung in „orange“-Augenimplantaten* (Abb. 2, Eper. 5—8). Die Meßergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen an der äußerlich sichtbaren Augenfarbe (Tabelle 4). Die „orange“-Implantate wurden im $+$ -Wirt annähernd wildrot. Sie enthalten mindestens soviel rote Pigmente wie $+$ -Implantate im $+$ -Wirt (Vergleich Exper. 1 mit Exper. 5). In *v*- und *cn*-Wirten erreichen die *v/v*; *cn/cn*; *ry²/ry²*-Implantate ein ebenso intensives Hellrot wie ihre Wirte und entsprechend hoch liegen auch die Meßwerte (Exper. 6 und Exper. 7). Daß ein „orange“-Auge im $+$ -Wirt dunkelrot, im *v*- oder *cn*-Wirt dagegen nur hellrot wird, beruht auf der im $+$ -Wirt durch den *v⁺*- und *cn⁺*-Locus ermöglichten zusätzlichen Ommochrombildung (braune Augenpigmente).

Von besonderem Interesse ist die Kombination *w^vv*-Wirt mit „orange“-Implantat (Exper. 8). Hier kann der Wirt infolge der Mutation am *w*-Locus selbst keine roten Pigmente bilden; er vermag aber andererseits dem implantierten „orange“-Auge soweit zu helfen, daß ihm eine Pigmentproduktion ermöglicht wird, die durchaus das Niveau eines implantierten Wildauges erreicht. Möglicherweise wird bei dieser Kombination, bei der im Wirt selbst keine roten Pigmente deponiert werden, vom Implantat sogar mehr Farbstoff gebildet als in einem sich ausfärbenden Wirt. Ein solcher Effekt wäre vergleichbar mit einem Befund, den EPHRUSSI und CHEVAIS (1938) für die nicht-autonome Bildung der braunen Augenpigmente erheben konnten. Es müßte eine negative Korrelation bestehen zwischen dem Selbstverbrauch und der Menge des abgegebenen Wirkstoffes.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß ein „orange“-Primordium durch einen Wirt, der selbst am *ry*-Locus nicht mutiert ist (*ry⁺*), sich so weit beeinflussen läßt, daß eine nicht-autonome Vermehrung der roten Augenpigmente zustande kommt. Es ist ein durch den Körper diffundierendes oder im Hämolymphestrom zirkulierendes *ry⁺*-Agens zu postulieren. Dabei soll vollständig offenbleiben, ob es sich hier um ein mehr primäres oder weitgehend sekundär bedingtes Genprodukt des *ry⁺*-Locus handelt.

δ) *„Hemmung“ der Pigmentbildung durch den „orange“-Wirt* (Abb. 2, Exper. 9 bis 12). Wie wir eben feststellten, ist ein *ry⁺*-Agens notwendig, zur Bildung einer Normalmenge an roten Pigmenten in den Augen, die am *ry*-Locus selbst mutiert sind. Dieses Agens ist aber auch unentbehrlich für die volle Ausfärbung von Augen der Wildrasse ($+$) oder der Mutanten *cn* und *v*. Im „orange“-Wirt erscheint die Pigmentbildung der $+$, *v* und *cn*-Implantate sehr stark ge-

hemmt (Exper. 9—11). Es wird zwar das für „orange“-Augen charakteristisch tiefe Niveau etwas übertroffen, doch bleibt die Pigmentmenge durchschnittlich 2—3mal geringer als in Implantatsaugen, die sich im eigenen ry^+ -Genotypus (Exper. 1—3) entwickeln können.

Allgemein ergibt sich ein interessanter entwicklungsphysiologischer Befund: Die Produktion der roten Augenpigmente ist von genbedingten Stoffen abhängig, die im Körper außerhalb der merkmalsbildenden Augenzellen produziert werden. Die Pigmentbildung ist also mindestens teilweise allophänisch bedingt (vgl. HADORN 1955).

ε) *Beeinflussung der Wirtsaugen.* Eine Hemmung der Pigmentbildung im Auge des Wirtes durch „orange“-Implantate konnte nicht festgestellt werden (Exper. 5—7). Dagegen beeinflussen offensichtlich Implantate der ry^+ -Genotypen das ry^2 -Wirtsaugen so weit, daß seine Pigmentproduktion ungefähr verdoppelt wird (aufwärts gerichtete Pfeile der Exper. 9—11). Eine entsprechende Förderung ließ sich erwartungsgemäß im u^v -Wirt nicht nachweisen (Exper. 12).

5. Nicht-autonome Bildung der roten Augenpigmente in reziproken Transplantationen mit dem ry^2 -Stamm

a) *Vorbemerkungen.* Die besprochenen Grundversuche wurden mit dem „orange“-Stamm durchgeführt, der außer dem ry^2 -Faktor noch die Gene v und cn enthält. Wir werden jetzt auf die zahlreichen Transplantationen von Augenanlagen eingehen, zu denen wir den „reinen rotbraun“-Stamm verwendeten. Bei diesem Genotypus (S. 530) sind die v - und cn -Faktoren durch Wildallele (+) ersetzt (+/+; +/+; $ry^2/ry^2 = ry^2$ -Stamm).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengestellt. Obschon wir stets mit gleicher Methodik arbeiteten, streuen die Meßwerte in einzelnen Versuchsserien doch recht stark. Dies beruht zunächst darauf, daß die implantierten Augenscheiben sich häufig nicht maximal entwickeln und daher oft nicht die für ein Implantat mögliche Normalgröße erreichen. Schädigungen beim Implantationsverfahren oder ungünstige Lagen im Wirtsabdomen mögen hier eine Rolle spielen. Sodann kann auch das Chromatographieren die Homogenität einer Versuchsserie etwas beeinträchtigen. Schließlich wurden in einigen Versuchsserien nur wenige Augen transplantiert und gemessen.

Wir beschränken uns daher in der Auswertung der Meßergebnisse der Tabelle 5 auf die gut gesicherten Resultate und verzichten auf Folgerungen, die zwar möglich und interessant wären, deren quantitative Grundlage aber nicht genügend feststeht.

Es sollen vor allem folgende Fragen beantwortet werden: Gibt es Unterschiede im nicht-autonomen Verhalten zwischen dem „orange“- und dem „rotbraunen“ ry^2 -Stamm? Wie wirken Genotypen, die selbst kein oder nur wenig rotes Augenpigment bilden, auf den ry^2 -Genotypus? Wie ist die gegenseitige Beeinflussung von Wirt und Implantat bei reziproken Transplantationen, zu denen verschiedene Gen-Kombinationen verwendet wurden?

b) *Bestätigung der Befunde des Grundversuches.* Alle allgemeinen Ergebnisse, die aus den Transplantationsexperimenten mit dem „orange“-Stamm gewonnen wurden (Abb. 2), ließen sich mit dem reinen ry^2 -Stamm bestätigen. Im + -Wirt bilden

Tabelle 5. *Meßwerte* (Galvanometerablesungen: Mittelwerte und mittlere Fehler) *für die Menge der roten Pigmente je Einzelaug* (*n* Zahl der chromatographierten und gemessenen Augen).

Die Zahlen sind nicht direkt vergleichbar mit den Galvanometerablesungen der Abb. 2

Ex- periment	Genotypen		Pigmentwerte je Auge			
	Wirt	Implantat	Wirt	<i>n</i>	Implantat	<i>n</i>
1a	+ ♀	—	28,4 ± 1,3	5	—	—
b	+ ♂	—	27,4 ± 0,7	11	—	—
2a	+ ♀	+	27,0 ± 0,7	15	14,5 ± 0,8	16
b	+ ♂	+	22,3 ± 0,8	17	12,3 ± 0,5	12
3a	+ ♀	<i>ry</i> ²	26,8 ± 0,5	10	15,0 ± 0,8	10
b	+ ♂	<i>ry</i> ²	23,3 ± 0,7	12	13,3 ± 0,7	14
4a	<i>ry</i> ² ♀	—	6,6 ± 0,3	57	—	—
b	<i>ry</i> ² ♂	—	5,5 ± 0,2	53	—	—
5a	<i>ry</i> ² ♀	<i>ry</i> ²	8,3 ± 0,7	10	6,8 ± 0,6	10
b	<i>ry</i> ² ♂	<i>ry</i> ²	5,3 ± 0,6	4	5,3 ± 0,5	4
6a	<i>ry</i> ² ♀	+	10,3 ± 1,1	12	7,7 ± 0,7	13
b	<i>ry</i> ² ♂	+	6,9 ± 0,6	11	5,0 ± 0,5	11
7a	<i>w</i> ♀	<i>ry</i> ²	0	—	15,4 ± 0,7	8
b	<i>w</i> ♂	<i>ry</i> ²	0	—	15,7 ± 0,5	9
8a	<i>bw</i> ♀	<i>ry</i> ²	0	—	18,8 ± 0,1	6
b	<i>bw</i> ♂	<i>ry</i> ²	0	—	17,4 ± 1,5	5
9a	<i>se</i> ♀	<i>ry</i> ²	0	—	16,7 ± 1,3	9
b	<i>se</i> ♂	<i>ry</i> ²	0	—	13,9 ± 1,1	8
10a	<i>cnbw</i> ♀	<i>ry</i> ²	0	—	13,1 ± 0,1	10
b	<i>cnbw</i> ♂	<i>ry</i> ²	0	—	16,3 ± 0,7	6
11a	<i>wa</i> ♀	<i>ry</i> ²	0	—	16,1 ± 0,8	10
b	<i>wa</i> ♂	<i>ry</i> ²	0	—	15,5 ± 0,4	14
12a	<i>ca</i> ♀	—	5,0 ± 0,3	10	—	—
b	<i>ca</i> ♂	—	3,1 ± 0,3	8	—	—
13a	<i>ca</i> ♀	<i>ry</i> ²	4,2 ± 0,4	15	14,7 ± 0,5	16
b	<i>ca</i> ♂	<i>ry</i> ²	2,8 ± 0,2	9	13,5 ± 1,1	4
14a	<i>ma</i> ♀	—	4,5 ± 0,7	4	—	—
b	<i>ma</i> ♂	<i>ry</i> ²	4,5 ± 1,0	4	14,5 ± 0,2	4
15a	<i>p</i> ♀	—	9,1 ± 0,5	9	—	—
b	<i>p</i> ♂	—	7,1 ± 0,3	8	—	—
16a	<i>p</i> ♀	<i>ry</i> ²	7,7 ± 0,6	4	19,7 ± 1,5	3
b	<i>p</i> ♂	<i>ry</i> ²	7,3 ± 0,4	9	18,8 ± 0,9	7
17a	<i>mah</i> ♀	—	17,7 ± 0,6	6	—	—
b	<i>mah</i> ♂	—	20,7 ± 0,7	9	—	—
18a	<i>mah</i> ♀	<i>ry</i> ²	20,3 ± 0,6	12	16,1 ± 0,6	9
b	<i>mah</i> ♂	<i>ry</i> ²	19,2 ± 0,9	9	16,1 ± 0,7	7
19a	<i>rs</i> ² ♀	—	22,6 ± 1,3	7	—	—
b	<i>rs</i> ² ♂	—	18,0 ± 0,6	6	—	—
20a	<i>rs</i> ² ♀	<i>ry</i> ²	21,1 ± 0,9	11	16,9 ± 1,0	8
b	<i>rs</i> ² ♂	<i>ry</i> ²	17,5 ± 0,5	9	14,6 ± 0,6	7
21a	<i>ry</i> ² ♀	<i>se</i>	6,3 ± 0,5	10	0	—
b	<i>ry</i> ² ♂	<i>se</i>	5,2 ± 0,4	5	0	—
22a	<i>ry</i> ² ♀	<i>wav</i>	10,2 ± 0,9	6	0	—
b	<i>ry</i> ² ♂	<i>wav</i>	7,8 ± 0,9	5	0	—
23a	<i>ry</i> ² ♀	<i>wa</i>	11,3 ± 0,8	6	0	—

ry^2 -Augen ebensoviel Pigment wie $+$ -Implantate (Tabelle 5; Exper. 3 gegen 2). Dabei bewirkt das ry^+ -Agens in den ry^2 -Augen mindestens eine Verdoppelung der Pigmentmenge (Exper. 3 gegen 5). Die Ausfärbung der $+$ -Implantate wird im ry^2 -Wirt gehemmt und beinahe oder ganz auf das Niveau eines ry^2 -Implantates herabgedrückt (Exper. 6 gegen 5).

Zwischen dem „orange“-Stamm (mit v und cn) und dem reinen ry^2 -Stamm gibt es allerdings einen quantitativen Unterschied: die roten Augenpigmente sind bei „orange“ extremer reduziert als beim „rotbraunen“ ry^2 -Stamm. Dies geht aus einem Vergleich der relativen Meßwerte der Abb. 2 mit denjenigen der Tabelle 5 hervor. Nach Abb. 2 (Exper. 1 gegen 4) verhalten sich die Pigmentmengen der $-$ -Wirtsaugen zu denjenigen der „orange“-Wirtsaugen (Genotypus $v/v; cn/cn; ry^2/ry^2$) wie $17:2,8 =$ etwa 6. Bei der anders eingestellten Meßvorrichtung der Experimente von Tabelle 5 ergibt sich für beide Geschlechter zusammen ein Verhältnis der entsprechenden Mittelwerte der Wirtsaugen (Exper. 3 gegen 5) von $25:7,4 =$ etwa 3,4 (für $+/+; ry^2/ry^2$). Mit der gleichen Meßanordnung, die wir für die Kontrolle ry^2/ry^2 (Tabelle 5, Exper. 4) benutzten, wurden nun auch Einzelaugen eines „orange“-Stammes vom Genotypus $cn/cn; ry^2/ry^2$ gemessen (Abb. 3, Serie 1). In Tabelle 6 werden die Mittelwerte für den reinen $+/+; ry^2/ry^2$ -

Stamm den Mittelwerten für $cn/cn; ry^2/ry^2$ gegenübergestellt; es enthält also auch hier „orange“ nur rund die Hälfte der roten Pigmente von „rotbraun“. Da dieser zweite „orange“-Stamm durch mehrfache und andere Auskreuzungen gewonnen wurde als der erste, in den Grundversuchen benutzte $v/v; cn/cn; ry^2/ry^2$ -Stamm, so ist es wahrscheinlich, daß die verstärkte Reduktion der roten Pigmente bei „orange“ durch die Gene v und cn bedingt ist. Es handelt sich somit nicht allein um die Auswirkung des übrigen genotypischen Milieus. Da die v - und cn -Loci zur Hauptsache an der Wirkstoffkette angreifen, die zu den braunen Augenpigmenten führt, würde unsere Feststellung bedeuten, daß sich eine *pleiotrope Nebenwirkung dieser Gene auch auf der Seite der roten Pigmente manifestiert*.

c) Das Vorkommen des ry^+ -Agens bei verschiedenen Augenfarbmутanten. Aus dem in Abb. 2 (S. 537) dargestellten Grundversuch mit dem „orange“-Stamm geht bereits hervor, daß nicht nur der Wildstamm ($+$), sondern auch die Mutanten v , cn und der Genotypus $w^a v$ das ry^+ -Agens enthalten. Überall erreichen die implantierten „orange“-Augen einen normalen Gehalt an roten Pigmenten.

Mit den Experimenten 7—20 der Tabelle 5 prüften wir dieses nicht-autonome Verhalten für Augenscheiben des ry^2 -Stammes. Dabei wählten wir die Wirte nach den folgenden drei Kriterien: 1. Genotypen, die selbst keine roten Augenpigmente bilden können (w , bw , se , $cnbw$ und w^a ; Exper. 7—11); 2. Genotypen, für die eine starke Reduktion in der Pigmentbildung charakteristisch ist (ca , ma und p ; Exper. 12—16); 3. Genotypen, deren sichtbare Augenfarbe weitgehend mit dem Rotbraun des ry^2 -Stammes übereinstimmt, bei denen aber recht viel rote Pigmente entstehen (mah und rs^2 ; Exper. 17—20).

Tabelle 6. Meßwerte für die roten Augenpigmente der Stämme „rotbraun“ ($+/+; ry^2/ry^2$) und „orange“ ($cn/cn; ry^2/ry^2$). (Mittelwerte und mittlere Fehler für ein Auge.) n Zahl der gemessenen Einzelaugen

Genotypus	Pigmentwerte	n
$+/+; ry^2/ry^2$ ♀	$6,6 \pm 0,3$	57
$+/+; ry^2/ry^2$ ♂	$5,5 \pm 0,2$	53
$cn/cn; ry^2/ry^2$ ♀	$3,4 \pm 0,2$	23
$cn/cn; ry^2/ry^2$ ♂	$2,2 \pm 0,2$	12

Die Pigmentwerte der ry^2 -Implantate (Tabelle 5) beweisen, daß alle geprüften Genotypen so auf die ry^2 -Augen einwirken, daß eine für Wildaugen charakteristische Menge an roten Pigmenten gebildet wird. Damit ist gezeigt, daß auch jene Mutanten, bei denen die Pigmentsynthese völlig blockiert oder stark beeinträchtigt ist, das ry^+ -Agens enthalten und abgeben können. Wir wissen nun aber auch, daß der ry -Locus an einer andern Stelle der Wirkstoffkette eingreift als die übrigen geprüften Genloci. Bisher fanden wir noch keine Mutante, die nicht befähigt ist, dem ry^2 -Genotypus das zur vollen Pigmentbildung benötigte „Kettenglied“ zu liefern.

Ob im Ausmaße der Wirtshilfe sich die geprüften Mutanten unterscheiden, können wir auf Grund der vorliegenden Anzahl von Meßwerten nicht entscheiden. Die Pigmentmengen der ry^2 -Implantate streuen alle um einen Wert, wie er für einen Wildgenotypus charakteristisch ist.

d) Die Beeinflussung der ry^2 -Wirtsaugen. Mit den Experimenten 9—11 des Grundversuches (Abb. 2) wurde gezeigt, daß implantierte Augenscheiben der Genotypen $+$, v und cn im Auge eines „orange“-Wirtes eine Zunahme an roten Pigmenten bewirken. Ein entsprechendes nicht-autonomes Verhalten ließ sich bei „rotbraunen“ ry^2 -Wirten bestätigen. Nachgewiesen (Tabelle 5) scheint eine Vermehrung der Pigmente in ry^2 -Wirtsaugen durch Implantate der Genotypen: $+$ (Exper. 6 gegen 4 und 5), w^v (Exper. 22 gegen 4 und 5) und w^u (Exper. 23 gegen 4 und 5). Dagegen konnte in den bisherigen Experimenten die Pigmentmenge in den ry^2 -Wirtsaugen durch se -Augenimplantate nicht vermehrt werden (Exper. 21 gegen 4 und 5). Ebenfalls war es bisher nicht möglich, eine gesicherte Förderung oder „Nicht-Förderung“ der Pigmentbildung in ry^2 -Wirten durch folgende Implantatgenotypen nachzuweisen: bw , ca , p , rs^2 , ma , mah und w . Wir verzichten auf die Wiedergabe der betreffenden Meßwerte. Sie streuen im Bereiche des Standardwertes der Kontrolltiere (Exper. 4, Tabelle 5).

Da die Ausfärbung von ry^+ -Augenimplantaten durch einen ry^2 -Wirt stark gehemmt wird (Tabelle 5, Exper. 6), fragt es sich, ob eventuell auch die Pigmentbildung in einem ry^+ -Wirtsauge durch ein ry^2 -Implantat beeinträchtigt werden könnte. Aus den Ergebnissen mit dem „orange“-Stamm resultierten keine diesbezüglichen Hinweise (Abb. 2: Vergleich der Exper. 1 mit 5, 2 mit 6, und 3 mit 7). Ebenso wenig kann eine derartige Wirkung für verschiedene Experimente mit dem ry^2 -Stamm (Tabelle 5) nachgewiesen werden (Vergleich der Exper. 2 mit 3, 14a mit 14b und 17 mit 18). Einzig bei den Experimenten 12/13 und 15a/16a erscheinen die Meßwerte der Wirtsaugen erniedrigt, wenn die Tiere ry^2 -Implantate tragen; doch sind solche Unterschiede nach den auf S. 539 diskutierten Möglichkeiten der Streuungsbeeinflussung nicht gesichert. Es ist somit vorläufig nicht erwiesen, daß ein ry^2 -Implantat fähig wäre, hemmend auf die Pigmentbildung im Auge eines ry^+ -Wirtes einzuwirken.

e) Die Beeinflussung der Implantatsaugen durch ry^2 -Wirt. Die Grundversuche mit dem ursprünglichen „orange“-Stamm haben gezeigt, daß die implantierten Augen der Genotypen $+$, v und cn in ry^2 -Wirten viel weniger rote Pigmente bilden als in Wirten, die das Normalallel (ry^+) enthalten (Abb. 2, Exper. 9—11 gegen 1—3). Derselbe Befund ergibt sich für $+$ -Implantate in rotbraunen ry^2 -Wirten (Tabelle 5, Exper. 6 gegen 2). Wir haben nun die Pigmentbildung zahlreicher weiterer Genotypen in ry^2 -Wirten geprüft. Es handelt sich um die reziproke

Transplantation zu den in Tabelle 5 (Exper. 7—20) aufgeführten Kombinationen. Augenimplantate, die aus Genotypen stammen, die kein rotes Pigment aufbauen (z. B. *w*, *bw*, *se*, *cnbw* und *w''* sowie *w''v*) verhalten sich autonom: sie bilden erwartungsgemäß auch im *ry*²-Wirt keine roten Pigmente. (Dagegen verhält sich — wiederum erwartungsgemäß — ein *w''v*-Implantat nicht autonom in bezug auf die braunen Augenpigmente, da ein *ry*²-Wirt den *v*⁺-Stoff zur Verfügung stellt.)

Transplantatäugen, die ihrem Genotypus gemäß *in situ* mehr oder weniger große Mengen an roten Pigmenten enthalten (*ca* < *ma* < *p* < *mah* < *rs*² < *cn*) bilden in *ry*²-Wirten ausnahmslos eine stark verminderte Pigmentmenge. Dabei wird höchstens ein Meßwert erreicht, wie er für das jeweilige *ry*²-Wirtsauge charakteristisch ist (z. B. von *+* und *cn*-Implantaten). Für andere Genotypen (*ca*, *ma*, *p*, *mah*, und *rs*²) liegen die Meßwerte der Implantate meist wesentlich unter dem Wert des *ry*²-Wirtes. Dabei besteht keine direkte Korrelation zwischen der Stärke der Reduktion im *ry*²-Wirt und der Menge der roten Pigmente in den Normaltieren dieser Genotypen. Der Grad der Autonomie oder das Ausmaß der Abhängigkeit von der Zufuhr des *ry*⁺-Agens erscheint daher je nach Genotypus verschieden. Da noch nicht alle notwendigen Kontrollimplantationen durchgeführt werden konnten, möchten wir auf eine Diskussion dieser interessanten Befunde verzichten. Es steht jedenfalls fest, daß die Nicht-Autonomie im *ry*²-Wirt sich bei allen geprüften Genotypen manifestiert, deren Augenprimordien selbst den *ry*⁺-Locus enthalten und die in normaler Umgebung auch befähigt sind, eine genotypisch unterschiedlich hohe Menge an roten Augenpigmenten zu bilden.

6. Das Vorkommen des *ry*⁺-Agens in verschiedenen Organsystemen

a) **Vorbemerkungen.** Aus den bekannten Untersuchungen über die nicht-autonome Bildung der braunen Ommochrompigmente der Insekten wissen wir, daß die genbedingten Wirkstoffe nicht von allen Organen genetisch normaler Spender gleichmäßig abgegeben werden. So sind nach KÜHN, CASPARI und PLAGGE (1935) bei *Ephesia* vor allem die Hoden-, Ovar- und Gehirnimplantate der Wildrasse gute Spender des *a*⁺-Stoffes. Bei *Drosophila* geben die MALPIGHISCHEN Gefäße sowohl den *v*⁺-Stoff wie den *cn*⁺-Stoff ab, während der larvale Fettkörper nur den *v*⁺-Stoff liefert (BEADLE 1937). Hoden, Ovarien und Gehirn können dagegen einem am *v*- oder *cn*-Locus mutierten *Drosophila*-Wirt keine Wirkstoffe zur Verfügung stellen.

Für uns lag es daher nahe, verschiedene Zellsysteme aus *ry*⁺-Spendern in *ry*²-Larven zu implantieren, um festzustellen, ob die Implantate eine Vermehrung der roten Augenpigmente des Wirtes bewirken können. Wir verwendeten für unsere Versuche als Spender einen *cn/cn*; *+/+*-Stamm und als Wirt einen *cn/cn*; *ry*²/*ry*²-Stamm („orange“). Die Unterschiede in der Menge der roten Augenpigmente zwischen dem Spendergenotypus sind in Abb. 3 dargestellt. Es handelt sich um die Meßergebnisse an Einzelaugen von 5 oder 2 Tage alten Imagines. In der „orange“-Kontrollserie (Serie 1: OrK) streuen die Pigmentmessungen um einen Mittelwert von 3 Skalenteilen des Galvanometers. Die Augen der größeren Weibchen liefern, wie üblich, etwas mehr Pigment als diejenigen der Männchen. Die *cn*-Imagines erreichen dagegen einen Pigmentwert von etwa 20 Einheiten (Abb. 3; Serie 7: cnK). Wirt und Spender unterscheiden sich somit sehr stark.

b) Augenimaginalscheiben. Wie bereits dargelegt wurde, bewirken implantierte Augenanlagen der Spender $+$, v und cn eine Vermehrung der Pigmentbildung in den Augen von „orange“-Wirten (Abb. 2; Exper. 9–11). Eine entsprechende Förderung ergab sich auch in den „rotbraunen“ ry^2 -Wirten, und zwar durch implantierte Augenscheiben der Spendergenotypen $+$, w^av und w^a (Tabelle 5; Exper. 6, 22 und 23). Ein im Abdomen eines ry^2 -Wirtes metamorphosierendes ry^+ -Auge gibt somit das ry^+ -Agens ab.

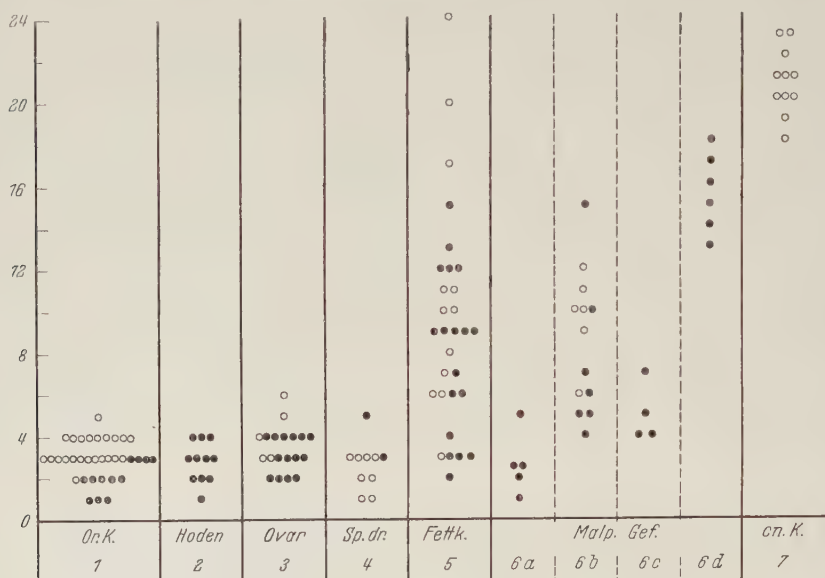


Abb. 3. Meßwerte für die Quantität der roten Pigmente (Fluoreszenzintensität; Ordinate) von Einzel-
augen der Wirte. Offene Kreise für weibliche, ausgefüllte Kreise für männliche Imagines. Serie 1:
„orange“-Kontrollen = cn/cn ; ry^2/ry^2 (Or K.). Serien 2–6: „orange“-Wirte, denen Hoden, Ovarien,
Speicheldrüsen, Fettkörper und MALPIGHISCHE Gefäße von cn/cn ; $+/+$ -Spendern implantiert worden
waren. Serie 7: cn/cn ; $+/+$ -Kontrollaugen (cn K.). Die gemessenen Augen stammen in den Serien 3
und 4 aus 2 Tage alten, in den übrigen Serien (1–2 und 5–7) aus 5 Tage alten Imagines

e) Hoden und Ovarien. Gonaden aus Larven des 3. Stadiums von cn -Spendern wurden möglichst frei aus dem umgebenden Fettkörper herauspräpariert und in „orange“-Wirte implantiert. Die Augen der 2 bzw. 5 Tage alten Wirtsimagines zeigten keinen Implantatseinfluß. Aus den Meßwerten der Abb. 3 ist ersichtlich, daß auch die im Chromatogramm entwickelte Pigmentmenge kaum über dem Niveau der „orange“-Kontrollen steht (Vergleich der Serien 2 und 3 mit der Serie 1). Eine geringe Förderung dürfte wohl darauf beruhen, daß es in einzelnen Fällen nicht gelungen ist, alle anhaftenden Fettkörperzellen von den larvalen Gonaden abzupräparieren.

Die Meßwerte der Serien 2 und 3 unserer Abb. 3 beziehen sich übrigens nur auf solche Wirtsfiegen, in deren Abdomen eine voll entwickelte Implantatsgonade gefunden wurde. Es handelt sich also ausnahmslos um Fälle, in denen das Implantat hätte wirken können. Die Gonaden geben somit kein ry^+ -Agens ab.

d) Larvale Speicheldrüsen. Unterschiedlich große Stücke wurden von cn -Speicheldrüsen abgetrennt und in „orange“-Larven implantiert. Da die Implantate während der Metamorphose des Wirtes aufgelöst werden, konnte das Ge-

lingen des Experimentes durch eine Sektion der Wirtsimagines nicht nachgeprüft werden. Doch dürfen wir auf Grund unserer Erfahrungen annehmen, daß in der Mehrzahl der operierten Fälle das Implantat vom Wirtskörper nicht nachträglich noch ausgestoßen wurde. Die Meßwerte (Abb. 3; Serie 4) für die Augen der 2 Tage alten Wirtsimagines liegen ausnahmslos auf dem tiefen Niveau der orange-Kontrollserie. Die larvalen Zellen der *ry*⁺-Speicheldrüsen setzten somit kein *ry*⁺-Agens frei.

e) Larvaler Fettkörper. Wir implantierten verschieden große Zellkomplexe, die von *cn*-Fettkörpern abgeschnitten wurden, in die „orange“-Wirtslarven. Bei vielen Wirtsimagines zeigte bereits die äußerlich sichtbare Augenfarbe einen deutlichen Implantatseinfluß. Neben Fliegen mit orangerot-farbigen Augen fanden sich auch Individuen, deren Augenfarbe annähernd ebenso tiefhellrot erschien, wie bei *cn*-Kontrollen. Die Meßergebnisse (Abb. 3; Serie 5) bestätigen diesen Befund. In der Mehrzahl der Fälle (5 Tage alte Imagines) ist die Menge der roten Augenpigmente deutlich bis stark über das Niveau der „orange“-Kontrollserie (Serie 1) hinaus vermehrt. Bei einzelnen Fliegen wird sogar der für die *cn*-Mutante charakteristische Normalwert erreicht.

Die große Streuung beruht sicher darauf, daß wir recht unterschiedlich große Implantate einspritzten. Da der larvale Fettkörper (ebenso wie die Zellen der larvalen Speicheldrüse) während der Metamorphose abgebaut wird, konnte keine Sektionskontrolle über das Gelingen des Experimentes oder die Größe der implantierten Stücke Aufschluß geben. Der Befund ist aber eindeutig: Die Zellen eines larvalen *ry*⁺-Fettkörpers geben das *ry*⁺-Agens in hochwirksamen Quantitäten ab.

f) MALPIGHISCHE Gefäße. Mit einer Pipette, deren Einschnürung genügend weit von der Spitze entfernt ist, läßt sich ein vorderes oder hinteres Paar der dünnen MALPIGHISCHEN Gefäße in voller Länge implantieren. Es gelingt überdies relativ leicht, kleinere Stücke zu implantieren, um auf diese Weise eine Dosierung des übertragenen Zellmaterials zu erreichen. Da die larvalen MALPIGHISCHEN Gefäße die Metamorphose überstehen, kann eine nachträgliche Sektion zeigen, wieviel Material in einem Wirt wirken konnte.

Wir unterteilen unsere Versuchsserie, bei der unterschiedlich große Stücke aus *cn*-Spendern in „orange“-Wirt implantiert wurden, in vier Unterserien (Abb. 3; Serien 6a—d). Alle Meßwerte beziehen sich auf 5 Tage alte Wirtsimagines.

In den Wirtsabdomen der Serie 6a konnten wir bei der Sektion keine Implantate finden. Wahrscheinlich wurden hier die injizierten Stücke wieder ausgestoßen. Dementsprechend liegen die Meßwerte auf der Höhe der nichtoperierten orange-Kontrollen (Serie 1).

In der Serie 6b sind die Meßwerte solcher Imagines vereinigt, bei denen die Sektion das Vorhandensein von Implantaten verschiedener Größe ergab. Es sind überdies alle jene Fälle in diese Serie aufgenommen, für die bereits im Operationsprotokoll vermerkt ist, daß Stücke unterschiedlicher Länge zur Implantation kamen. Die Pigmentmenge der Wirtsaugen ist deutlich bis stark erhöht, streut aber über einen weiten Bereich.

Von den 4 Fällen der Serie 6c wissen wir auf Grund des Operationsprotokolles, daß absichtlich kleine Stücke implantiert wurden, die wir auf knapp $\frac{1}{2}$ der

Länge eines Gefäßes beschnitten haben. Es ist eine geringe, aber doch deutliche Pigmentförderung von diesen kleinen Implantaten ausgegangen.

Die Implantate der ebenfalls einheitlichen Serie 6d wurden so dosiert, daß je ein ganzes Paar injiziert wurde. Die Augen der Wirtsfiegen sind annähernd wie *cn* ausgefärbt, und die Meßwerte weisen auf eine entsprechend ausgiebige Förderung der Pigmentbildung hin. Es steht somit fest, daß Zellen der *ry*⁺-MALPIGHISCHEN Gefäße das *ry*⁺-Agens in wirksamen Quantitäten abgeben. Überdies zeichnet sich ein deutlicher Konzentrationseffekt ab. Die zusätzlich gebildete Pigmentmenge der *ry*²-Augen steigt mit der Quantität der implantierten *ry*⁺-Zellen an.

7. Nicht-autonomes Vorkommen von Isoxanthopterin in *ry*²-Organen

a) **Organspezifische und allgemeine Verbreitung von Isoxanthopterin.** Das regelmäßige Vorkommen eines tief violettblau fluoreszierenden Stoffes in Geweben von *Drosophila melanogaster* wurde zuerst von HADORN und MITCHELL (1951) festgestellt. Später zeigte sich, daß diese „Fl 3“-Substanz mit Isoxanthopterin identisch ist (HADORN 1954b, FORREST und MITCHELL 1955, NAWA und TAIRA 1954, VISCONTINI und Mitarbeiter 1955a, DE LERMA und DE VINCENTIIS 1955). Innerhalb des imaginalen Körpers finden wir das Isoxanthopterin in höchster Konzentration in den Hoden bzw. in den MALPIGHISCHEN Gefäßen der beiden Geschlechter. Die Augen enthalten nur wenig Isoxanthopterin; in den Ovarien und im Thorax kommt es nicht vor. Die Isoxanthopterinbildung beginnt am Ende des 3. Larvenstadiums und führt nach der Verpuppung rasch zu hohen Werten bei Männchen (Hoden) und zu tieferen Werten bei Weibchen (HADORN und MITCHELL 1951, HADORN 1954b). Zwischen den einzelnen Mutanten bestehen charakteristische Unterschiede. Sodann gibt es Genotypen, wie *w* und *bw*, bei denen das während der Metamorphose gebildete Isoxanthopterin in den ersten Tagen des Imaginallebens aus dem Fliegenkörper verschwindet (HADORN 1954b). Es konnte gezeigt werden, daß bei *w* das Isoxanthopterin zusammen mit anderen fluoreszierenden Stoffen mit den Exkreten der MALPIGHISCHEN Gefäße (Meconien) nach außen abgegeben wird (HADORN und KÜRSTEINER 1956).

Im einzelnen konnte von uns und von HADORN und MITCHELL (1951) mit papierchromatographischen Methoden das Isoxanthopterin in den auf S. 531 bereits aufgezählten 29 Genotypen von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden. Unter diesen Mutanten sind neben ommochromfreien Genotypen (wie *v*, *cn* und *w*) auch viele Genotypen vertreten, bei denen die roten Augenpigmente mehr oder weniger reduziert sind (z. B. *ltd*, *car*, *pr*, *ca*, *p*, *lt* usw.) oder gar völlig fehlen (z. B. *se* und *w*) (vgl. HADORN 1954a.) Um so überraschender ist daher der für *ry*² erhobene Ausnahmefund, wonach unsere Mutante kein Isoxanthopterin bildet (S. 531). Die Sonderstellung von *ry*² (und *ry*) wird außerdem noch dadurch charakterisiert, daß Isoxanthopterin im Stamme der Arthropoden weit verbreitet ist. Dieser Stoff konnte u. a. nachgewiesen werden bei verschiedenen *Orthoptera* (DE LERMA 1950), bei *Bombyx mori* (vgl. NAWA und TAIRA 1954), bei *Ephestia kühniella* (vgl. HADORN und EGELHAAF 1956) und bei *Astacra fluviatilis* (VISCONTINI, SCHMID und HADORN 1955).

Im folgenden berichten wir über Implantationen, mit denen versucht wurde, durch Organe aus *ry*⁺-Spendern die Bildung bzw. Speicherung von Isoxanthopterin in *ry*²-Wirten zu bewirken.

b) Augenimaginalscheiben. Ein erster Befund über nichtautonomes Vorkommen von Isoxanthopterin zeigte sich in Chromatogrammen der Hoden und Augen von ry^2 -Wirten, denen im Larvenstadium eine ry^+ -Augenanlage implantiert worden war. Diese Wirtsorgane lieferten meist einen schwachen (Hoden) bis sehr schwachen Isoxanthopterinfleck (Augen).

c) Hoden. Wir implantierten je einen möglichst fettkörperfreien Larvenhoden eines $+$ - oder cn -Spenders in männliche „orange“-Wirte. Zur Zeit der Implantation enthalten die cn -Hoden noch kein Isoxanthopterin. Selbst in Chromatogrammen, auf die 10 cn -Larvenhoden zusammen aufgetragen wurden, zeigt sich keine Spur eines Isoxanthopterinflecks.

Die metamorphosierten Wirte wurden 5 Tage nach dem Schlüpfen aufpräpariert. In 18 Fällen wurden drei Hoden gefunden (je Wirt); davon waren bei 9 Fällen je zwei Hoden normal an die Vasa efferentia angeheftet und spiralig ausgewachsen, während der dritte Hoden frei und ovoidförmig blieb. In den 9 übrigen Fällen entstanden komplizierte Fusionen zwischen Wirts- und Implantatshoden.

Nach Farbe, Form und Lage läßt sich innerhalb einer Dreiergruppe nicht entscheiden, welches die Wirtshoden sind und welches der Implantatshoden ist. Dies war für die chromatographische Analyse zu berücksichtigen. Dort, wo sich die Hoden getrennt entwickelt hatten, chromatographierten wir sie meist einzeln. In den Fusionsfällen wurden alle drei Hoden zusammen aufgetragen. Da das Zellmaterial eines Normalhodens einen sehr deutlichen Isoxanthopterinfleck liefert, mußte unsere Methode zeigen, ob als Folge der Implantation auch in den ry^2 -Wirtshoden Isoxanthopterin auftreten kann.

In einer Dreiergruppe befand sich stets ein Hoden mit viel Isoxanthopterin, dies mußte der $+$ - oder cn -Implantatshoden sein. Die beiden übrigen Hoden enthielten weniger Isoxanthopterin, lieferten aber doch auch deutliche Flecken. Diese ry^2 -Wirtshoden verhalten sich somit nicht-autonom. Die Anwesenheit eines ry^+ -Hodens hat ihnen ermöglicht, Isoxanthopterin selbst zu bilden oder zu speichern. Die chromatographierten Fusionsfälle bestätigen den Befund, wonach ein cn -Hoden fähig ist, im ry^2 -Wirt das Vorkommen von Isoxanthopterin zu bewirken.

d) Ovarien. Wir implantierten je ein larvales cn -Ovar (ry^+) in „orange“-Larven (ry^2). Sowohl in 13 männlichen wie in 5 weiblichen Wirten kamen die Implantate zur vollen Entwicklung. Die Hoden der ry^2 -Wirte wurden paarweise chromatographiert: sie enthielten kein Isoxanthopterin. Aber auch die implantierten cn -Ovarien, wie die Ovarien ihrer ry^2 -Wirte blieben frei von Isoxanthopterin.

Nun wissen wir (HADORN und MITCHELL 1951), daß selbst normale Ovarien von Wildstämmen (in situ) kein Isoxanthopterin enthalten. Eine Isoxanthopterinbildung war daher auch von cn -Ovarien, die ja ebenfalls den ry^+ -Locus enthalten, nicht zu erwarten. Die Implantationen zeigen nun, daß ein ry^+ -Ovar überhaupt keine Stoffe (Vorstufen) an einen ry^2 -Wirt abgeben kann, die diesem eine nicht-autonome Isoxanthopterinbildung ermöglichen würden.

e) Larvale Speicheldrüsen. Die implantierten cn -Drüsenstücke blieben wirkungslos. In ry^2 -Wirten (10 Fälle) war kein Isoxanthopterin nachzuweisen.

f) Larvaler Fettkörper. In der Abb. 3, Serie 5 (S. 544) haben wir die Meßwerte für die roten Augenpigmente von 12 weiblichen ry^2 -Wirten und 18 männlichen ry^2 -Wirten aufgetragen. Es handelt sich hier um Imagines, denen im Larvenstadium verschieden große Stücke larvaler cn -Fettkörper implantiert worden waren. Wir chromatographierten 5 Tage nach dem Schlüpfen alle 30 Abdomen einzeln. In 15 männlichen ry^2 -Wirtstieren konnten wir deutliche Isoxanthopterin-flecken feststellen; nur 3 männliche Abdomen lieferten kein Isoxanthopterin. Wahrscheinlich sind dies Fälle, bei denen das Fettkörperimplantat ausgestoßen wurde. In keinem der weiblichen „orange“-Wirten fanden wir Isoxanthopterin. Nun wissen wir aber auf Grund der Pigmentvermehrung in den Augen (Abb. 3, Serie 5), daß fast alle Weibchen, genau so wie die Männchen, wirksame Implantate getragen haben. Wenn trotzdem nur in dem Männchen Isoxanthopterin gefunden wurde, so beruht dies auf geschlechtsspezifischen Unterschieden. In 5 Tage alten weiblichen Imagines ist auch bei normaler genetischer Konstitution (Wildrasse) im Abdomen das Isoxanthopterin höchstens nur noch in Spuren nachzuweisen. Bei $+$ - oder cn -Männchen bleibt dagegen in den Hoden dieser Stoff zeitlebens in hoher Konzentration erhalten.

g) MALPIGHISCHE Gefäße. Die Hodenpaare der „orange“-Männchen der Versuchsserien 6a—d (Abb. 3, S. 544) wurden einzeln chromatographiert und auf das Vorkommen von Isoxanthopterin geprüft. In der Serie 6a, wo keine Implantate gefunden wurden, ergaben sich für 4 Tiere auf der „Isoxanthopterinhöhe“ der Chromatogramme nach Abzug der Papierblindwerte folgende Fluoreszenzintensitäten: 0; 0; 0,5; 0,5. Aus der inhomogenen Serie 6b, die Implantate verschiedener Größe enthielt, chromatographierten wir die Hoden von 7 Tieren und fanden folgende Meßwerte: 2; 3; 3; 3; 4; 5; 12. In der Serie 6c (4 Fälle mit kleinen Implantaten) betragen die Isoxanthopterinwerte: 1,5; 1,5; 2,5; 3,5. Für die Serie 6d (6 Fälle mit großen Implantaten) wurden folgende Werte bestimmt: 1; 2; 5; 6; 8; 20.

Die quantitativen Ergebnisse streuen recht stark, und wir können vorläufig nicht erklären, warum z. B. in der Serie 6d auch Fälle mit niedrigen Isoxanthopterinwerten vorkommen. Immerhin scheint sich eine positive Korrelation abzuzeichnen zwischen der Menge des implantierten Zellmaterials und der Menge des im Wirtshoden vorkommenden Isoxanthopterins. Jedenfalls steht fest, daß ry^2 -MALPIGHISCHE Gefäße in ry^2 -Wirtshoden die Bildung oder Speicherung von Isoxanthopterin bewirken können.

h) Quantitative Beziehungen zwischen roten Augenpigmenten und Isoxanthopterin. Bereits in den ersten chromatographischen Untersuchungen von HADORN und MITCHELL (1951) zeigte sich für eine Reihe von Augenfarbmutanten eine positive Korrelation zwischen den Meßwerten für rote Augenpigmente (Fl 1) und Isoxanthopterin (Fl 3). So nehmen in der Genotypenreihe $+$ $> st$ $> g^2$ $> lt$ $> w^a$ die Quantitäten für beide Stoffgruppen gleichsinnig ab. Allerdings gibt es auch Mutanten, wie pn^2 , die sehr wenig rote Augenpigmente, aber hohe Konzentrationen an Isoxanthopterin bilden.

Die ry^2 -Mutante bildet selbst kein Isoxanthopterin und nur sehr wenig rote Augenpigmente. Durch ry^+ -Implantate wird eine Vermehrung der roten Pigmente und das Vorkommen von Isoxanthopterin in ry^2 -Wirten bewirkt. Wir möchten

jetzt wissen, ob sich in bezug auf diese beiden Allophäne eine positive Korrelation nachweisen läßt. Leider verfügen wir zur Zeit nur über wenig Messungen, die verwertet werden können. In der Abb. 4 sind die Korrelationen dargestellt, die sich aus den Implantationsserien mit MALPIGHISCHEN Gefäße ergeben (vgl. Abb. 3, Serie 6). Wir stellen fest, daß bei geringer Förderung der Augenpigmente auch der Isoxanthopteringehalt der Wirtshoden gering bleibt. Dort aber, wo viel zusätzliches Augenpigment gebildet wurde, sind die Ergebnisse nicht eindeutig in bezug auf die festgestellten Isoxanthoptermengen. In einzelnen Fällen wurde sehr viel Isoxanthopterin gefunden, in anderen, nicht erklärbaren Fällen erscheint trotz starker Wirkung auf die Augen der Isoxanthopteringehalt der Hoden gering. Immerhin dürfen wir aus den Korrelationen der Abb. 4 schließen, daß *genbedingte Zusammenhänge bestehen zwischen der Bildung der roten Augenpigmente und des Isoxanthopterins*.

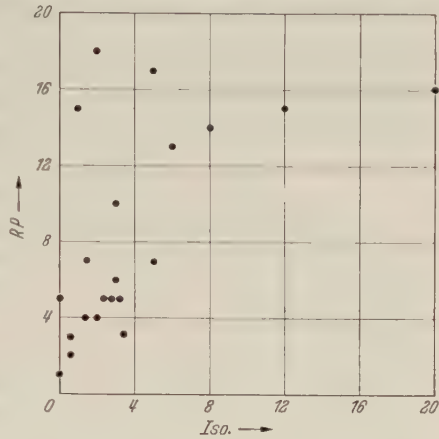


Abb. 4. Korrelation zwischen den Meßwerten für rote Augenpigmente (RP) und Isoxanthopterin (Iso) in Hoden bei ry^2 -Wirten nach Einwirkung verschieden großer ry^+ -Implantate (MALPIGHISCHE Gefäße)

8. Diskussion

Die mitgeteilten Befunde konnten zeigen, daß die ry^2 -Mutation es ermöglicht, eine Reihe interessanter genphysiologischer Fragen zu analysieren. Da diese Untersuchungsmöglichkeiten zur Zeit nur zu einem kleinen Teil ausgenutzt sind, möchten wir jetzt auf eine eingehende Diskussion der bereits erhobenen Befunde verzichten. Wir beschränken uns daher im folgenden darauf, nur noch jene Ergebnisse zu besprechen, die in den vorausgehenden Kapiteln nicht genügend berücksichtigt sind.

Auf Grund der Implantationsergebnisse haben wir ein ry^+ -Agens postuliert, das in einem ry^2 -Auge eine *nicht-autonome Vermehrung der roten Pigmente* bewirkt. In der Tabelle 7 ist nochmals zusammenfassend angegeben, welche der geprüften ry^+ -Organe das pigmentfördernde Agens abgeben. Außerdem ist gezeigt, welche von diesen Organimplantaten auch über die Fähigkeit verfügen, in den Hoden der ry^2 -Wirte das nicht-autonome Vorkommen von Isoxanthopterin zu bewirken. Mit Ausnahme der Hodenimplantate, die zwar auf die Wirtshoden (Isoxanthopterin), nicht aber auf die Wirtsaugen (rote Pigmente) wirken, besteht Übereinstimmung für die beiden nicht-autonomen Phäne. Vor allem ist auffallend, daß sowohl die Fettkörper wie die MALPIGHISCHEN Gefäße die Bildung der Augenpigmente wie auch das Auftreten von Isoxanthopterin im Wirt besonders stark fördern. Auf die möglichen genphysiologischen Zusammenhänge zwischen roten Augenpigmenten und Isoxanthopterin haben wir bereits hingewiesen (Abb. 4). Es muß künftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben, auch den Zusammenhängen nachzugehen, die sich in den weiteren Stoffen manifestieren, die von der pleiotropen Wirkung der ry^2 -Mutation beeinflusst werden. Da die HB-Pterine (S. 531)

bei ry^2 gegenüber der Wildform verstärkt sind, müßte das von Implantaten ausgehende ry^+ -Agens zu einer Verminderung dieser Stoffe im ry^2 -Wirtsorganismus führen. Erste, diesbezügliche Meßergebnisse scheinen diese Annahme zu bestätigen.

Tabelle 7. *Implantationserfolge (+ oder —) in bezug auf die Vermehrung der roten Augenpigmente und das Vorkommen von Hoden-Isoxanthopterin in cn/cn ; ry^2/ry^2 -Wirten, bewirkt durch verschiedene Organe aus cn/cn ; $+/+-$ -Spendern*

	Implantierte Organe						Kontrollen	
	Augen	Hoden	Ovar	Speichel- drüsen	Fett- körper	MALPI- GHISCHE Gefäße	Wirt	Spender
Rote Pigmente (Augen)	+	—	—	—	++	++	wenig	viel
Isoxanthopterin (Hoden)	+	+	—	—	++	++	fehlt	viel

Wenn wir im Hoden eines ry^2 -Wirtes das *nicht-autonome Auftreten von Isoxanthopterin* feststellen, so erhebt sich die Frage, ob dieser Stoff auch tatsächlich in den ry^2 -Wirtszellen selbst aufgebaut worden ist. Wir wissen zunächst nur, daß das Vorkommen von Isoxanthopterin durch ry^+ -Implantate verursacht ist. Die Hilfe, die von implantierten Augen, Hoden, MALPIGHISCHEN Gefäßen oder Fettkörpern ausgeht, könnte darin bestehen, daß dem Wirt eine unentbehrliche Vorstufe oder ein Ferment zur Isoxanthopterinbildung geliefert würde. In diesem Falle müßten die Wirtszellen die Weiterverarbeitung besorgen. Es könnte aber auch so sein, daß die Implantate an den Wirt direkt das fertige Isoxanthopterinmolekül abgeben würden. Jetzt müßten die ry^2 -Hoden nur über die Fähigkeit verfügen, dieses fremde genbedingte Produkt elektiv aufzunehmen und zu speichern. Die bisherigen Versuchsanordnungen erlauben nicht, zwischen den beiden Möglichkeiten, d. h. zwischen *Bildung oder Speicherung*, zu entscheiden.

Anders ist die Sachlage für die roten Augenpigmente. Fettkörper und MALPIGHISCHE Gefäße, die als Implantate stark wirksam sind, bauen diese Farbstoffe selbst nicht auf. Sie können daher dem ry^2 -Wirt höchstens eine noch farblose Pigmentvorstufe zur Verfügung stellen, die in den Augenscheiben zur Pigmentsynthese benötigt und verwendet wird. Weitere Versuche müssen schließlich entscheiden, ob die Nicht-Autonomie sowohl für rote Augenpigmente wie für Isoxanthopterin auf einem gemeinsamen ry^+ -Agens beruht.

Für die Bildungsmenge der roten Augenpigmente konnten wir eine *reziprok wirksame Nicht-Autonomie* feststellen. Einerseits bilden die ry^2 -Augen *in situ* oder als Implantate bedeutend mehr Pigmente, wenn sie der Wirkung von ry^+ -Organen ausgesetzt sind. Andererseits bilden die ry^+ -Augen als Implantate im ry^2 -Wirt bedeutend weniger rote Pigmente als in einem ry^+ -Wirt.

Eine *nicht-autonome Förderung* der roten Augenpigmente von der Art und dem Ausmaße, wie sie bei ry^2 -Anlagen möglich ist, konnte bis jetzt noch für keine *Drosophila*-Mutante nachgewiesen werden. Diese Förderung ist nur vergleichbar mit der bekannten Nicht-Autonomie, die in *v*- und *cn*-Anlagen für die Bildung der braunen Augenpigmente besteht. Ob für die von uns festgestellte „*Hemmung*“ der Ausfärbung auch Parallelbefunde auf der Seite der braunen Pigmente vorliegen, scheint noch nicht klar festzustehen. Möglicherweise könnte ein vergleich-

bares Phänomen bei einer von GOTTSCHESKI und TAN (1938) beobachteten Wirkung in *ruby*-Wirten von *Drosophila pseudoobscura* vorliegen. Deutlichere Parallelen aber ergeben sich zu dem eingehend untersuchten „claret-Effekt“ bei *Drosophila melanogaster* (vgl. CLANCY 1942). Es steht fest, daß unter bestimmten Bedingungen sich ein Wildauge im claret-Wirt (*ca*) nicht voll anfärben kann. Nach EPHRUSSI und CHEVAIS (1938) dürfen wir annehmen, daß ein Wildauge von sich aus die zur vollen „Braun-Ausfärbung“ genügende Menge von v^+ -Stoff nicht selbst bilden kann. Das + - Auge erreicht daher im *v*-Wirt, der keinen v^+ -Stoff liefert, nicht die volle Ausfärbung und auch der „claret-Effekt“ beruht darauf, daß die *ca*-Mutante nicht genügende Mengen an v^+ -Stoff liefern kann.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß Wildaugen, wie die Augen der weiteren von uns geprüften Genotypen, auch die roten Pigmente auf Grund eigener, d. h. autophänischer Reaktionen, nicht in vollem Ausmaße zu bilden vermögen. Es muß vom Körper her ein ry^+ -Agens fördernd eingreifen. Da dieses Agens im ry^2 -Wirt fehlt oder vermindert ist, kommt es zur beobachteten „Pigmenthemmung“. *Vom v^+ -Stoff unterscheidet sich das ry^+ -Agens aber darin, daß es nicht auf die braunen Pigmente, sondern auf die Bildung der roten Augenpigmente einwirkt.* Daß im ry^2 -Wirt ein anderes genbedingtes Kettenglied betroffen ist als bei *v*-, *cn*- oder *ca*-Mutanten, geht übrigens auch aus den reziproken Transplantationen hervor. So färben sich ry^2 -Augen sowohl in *v*- und *cn*-Wirten (Abb. 2, Exper. 6 und 7) wie auch in *ca*-Wirten (Tabelle 5, Exper. 13) völlig aus.

Zusammenfassung

1. Aus einem *cn bw*-Stamm von *Drosophila melanogaster* konnte eine neu aufgetretene Augenfarbmutante *rosy*² (ry^2) isoliert werden, für die der Locus 3—51 ± 1 bestimmt wurde. Durch Auskreuzung wurde eine Allelie zu *rosy* (*ry*) festgestellt.

2. Papierchromatographische Untersuchungen zeigten, daß ry^2 kein Isoxanthopterin enthält. Durch dieses biochemische Phän unterscheidet sich ry^2 in spezifischer Weise sowohl von der Wildform wie auch von 28 verschiedenen Mutanten, die alle Isoxanthopterin enthalten.

3. Das pleiotrope Wirkungsmuster von ry^2 ist durch folgende Phäne charakterisiert:

- a) Fehlen von Isoxanthopterin,
- b) starke Verminderung der roten Augenpigmente; dies bedingt rotbraune Augenfarbe für den Genotypus ry^2/ry^2 und hellorange Augenfarbe für die Kombinationen von ry^2 mit *v* oder *cn* (z. B. *cn/cn; ry^2/ry^2*),
- c) Vermehrung bestimmter Pterine,
- d) verkürzte und aufgeblähte MALPIGHISCHE Gefäße,
- e) Ausscheidung von gelb- bis orangefarbenen Exkretkugeln in das Lumen der MALPIGHISCHEN Gefäße,
- f) bei 25° C eine monophasische spätpupale bis frühimaginale Semiletalität.

4. Durch reziproke Transplantationen wird eine *Nicht-Autonomie für die Bildung der roten Augenpigmente* nachgewiesen. Die nachfolgenden Befunde stützen sich auf quantitative Bestimmungen der Fluoreszenzintensität des auf Papierchromatogrammen entwickelten Pigmentes einzelner Augen.

a) ry^2 -Augenanlagen färben sich in ry^+ -Wirten vollständig aus. Diese Nicht-Autonomie manifestiert sich in annähernd gleichem Ausmaße, auch wenn die

folgenden 11 Augenfarbmutanten als Wirte verwendet werden: *bw*, *ca*, *cn*, *p*, *ma*, *mah*, *rs*², *se*, *v*, *w* und *w*^a.

b) Durch folgende implantierte *ry*⁺-Organe kann in *ry*²-Wirtsaugen (*in situ*) eine Pigmentvermehrung bewirkt werden: Augenanlagen, larvaler Fettkörper, larvale MALPIGHISCHE Gefäße. Dagegen blieben Hoden, Ovarien und larvale Speicheldrüsen wirkungslos.

c) Zwischen dem Ausmaße der Pigmentvermehrung im *ry*²-Wirt und der Größe der implantierten Stücke von *ry*⁺-MALPIGHISCHEN Gefäßen besteht eine positive Korrelation.

d) *ry*⁺-Augenanlagen bilden in *ry*²-Wirten bedeutend weniger rote Pigmente als in *ry*⁺-Wirten. Eine entsprechende Minderleistung wurde auch für Augenimplantate folgender Spendergenotypen nachgewiesen: *rs*², *v*, *cn*, *ma*, *ca*, *mah*, *p*.

5. Augenanlagen, Hoden, larvale Fettkörper und MALPIGHISCHE Gefäße aus *ry*⁺-Spendern bewirken in den Hoden von *ry*²-Wirten das Vorkommen von *Isoxanthopterin*. Ob dieser Effekt auf einer *nicht-autonomen Bildung oder Speicherung* beruht, ist noch nicht entschieden.

6. Die festgestellten genphysiologischen Beziehungen zwischen den roten Augenpigmenten, dem Isoxanthopterin und den übrigen Phänen werden kurz diskutiert.

Literatur

- BEADLE, G. W.: Development of eye colors in *Drosophila*: fat bodies and Malpighian tubes in relation to diffusible substances. *Genetics* **22**, 587—611 (1937). — BEADLE, G. W., R. L. ANDERSON and J. MAXWELL: A comparison of the diffusible substances concerned with eye color development in *Drosophila*, *Ephestia* and *Habrobracon*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **24**, 80—85 (1938). — BEADLE, G. W., and B. EPHRUSSI: The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation. *Genetics* **21**, 225—247 (1936). — BREHME, K. S., and M. DEMEREC: A survey of Malpighian tube color in the eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Growth* **6**, 351—355 (1942). — BRIDGES, C. B., and K. S. BREHME: The mutants of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Instn. Wash. Publ.* **552**, 1—257 (1944). — BUTENANDT, A.: Biochemie der Gene und Genwirkungen. *Naturwiss.* **40**, 91—100 (1953). — CASPARI, E.: Über die Wirkung eines pleiotropen Gens bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ZELLER. *Roux' Arch.* **130**, 353—381 (1933). — CLANCY, C. W.: The development of eye colors in *Drosophila melanogaster*. Further studies on the mutant *claret*. *Genetics* **27**, 417—440 (1942). — EPHRUSSI, B.: Analysis of eye color differentiation in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **10**, 40—48 (1942). — EPHRUSSI, B., et S. CHEVAIS: Développement des couleurs des yeux chez la *Drosophile*: Relations entre production, utilisation et libération des substances diffusibles. *Bull. biol. France et Belg.* **72**, 48—78 (1938). — FORREST, H. S., and H. K. MITCHELL: Pteridines from *Drosophila*. I. Isolation of a yellow pigment. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 5656—5658 (1954a). — Pteridines from *Drosophila*. II. Structure of the yellow pigment. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 5658—5662 (1954b). — Pteridines from *Drosophila*. III. Isolation and identification of three more pteridines. *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 4865—4869 (1955). — GOTTSCHESKI, G., and C. C. TAN: The homology of the eye color genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura* as determined by transplantation. II. *Genetics* **23**, 221—238 (1938). — GREEN, M. M.: Homologous eye color mutants in the honeybee and *Drosophila*. *Evolution* **9**, 215—216 (1955). — HADORN, E.: Approaches to the study of biochemical and developmental effects of mutations. *Caryologia*, Suppl. zu Bd. **6**, 326—337 (1954a). — Ontogenetische Änderungen im Gehalt an Isoxanthopterin bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. *Experientia* (Basel) **10**, 483—484 (1954b). — Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpäthologie und Genphysiologie der Entwicklung. Stuttgart: Georg Thieme 1955. — HADORN, E., u. P. S. CHEN: Untersuchungen zur Phasenspezifität der Wirkung von Letalfaktoren bei *Drosophila melanogaster*. *Arch. Klaus-Stiftg* **27**, 147—163 (1952). — HADORN, E., u. A. EGELHAAF: Biochemische Polyphänie und Stoff-

verteilung im Körper verschiedener Augenfarb-Genotypen von *Ephesia kühniella*. Z. Naturforsch. **11b**, 21—25 (1956). — HADORN, E., u. A. KÜHN: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarb-Genen bei *Ephesia kühniella*. Z. Naturforsch. **8b**, 582—589 (1953). — HADORN, E., u. R. KÜRSTEINER: Unterschiede in Exkretstoffen bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stiftg. **30**, 8—12 (1956). — HADORN, E., and H. K. MITCHELL: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **37**, 650—665 (1951). — HADORN, E., and I. SCHWINCK: A mutant of *Drosophila* without Isoxanthopterin which is non-autonomous for the red eye pigments. Nature (Lond.) im Druck (1956). — HADORN, E., u. H. ZELLER: Fertilitätsstudien an *Drosophila melanogaster*. I. Untersuchungen zum altersbedingten Fertilitätsabfall. Roux' Arch. **142**, 276—300 (1943). — KIKKAWA, H.: Mechanism of pigment formation in *Bombyx* and *Drosophila*. Genetics **26**, 587—607 (1941). — KÜHN, A.: Entwicklungsphysiologische Wirkungen einiger Gene von *Ephesia kühniella*. Naturwiss. **20**, 974—977 (1932). — Weitere Untersuchungen über den Gen-A-Wirkstoff bei der Mehlmotte *Ephesia kühniella* Z. Ges. Wiss. Götting. Nachr. Biol. **2**, 239—249 (1936). — KÜHN, A., E. CASPARI u. E. PLAGGE: Über hormonale Genwirkungen bei *Ephesia kühniella* I. Ges. Wiss. Götting. Nachr. Biol. **2**, 1—29 (1935). — LERMA, B. DE: Ricerche sulla fluorescenza del sangue degli Ortoteri. Identificazione spettrografica della isoxanthopterin. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **26**, 528 (1950). — LERMA, B. DE, e M. DE VINCENTIIS: Identificazione chimica e valutazione biologica delle sostanze fluorescenti di *Drosophila melanogaster* MEIG. Boll. Zool. **22**, 1—15 (1955). — MAINX, F.: Analyse der Genwirkung durch Faktorenkombination. Versuche mit den Augenfarbfaktoren von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **75**, 256—276 (1938). — MOROHOSI, S.: Transplantation of optic discs and eye colors in *Bombyx mori*. Jap. J. Genet. **14**, 204—210 (1938). — NAWA, S., and T. TAIRA: Pterins found in Silkworm and *Drosophila*. Proc. Jap. Acad. **30**, 632—635 (1954). — NOLTE, D. J.: The eye-pigmentary system of *Drosophila*. III. The action of eye-colour genes. J. Genet. **51**, 142—186 (1952). — REIFF, M.: Fertilitätsstudien an *Drosophila melanogaster*. II. Fertilitätstypen bei Selektionsstämmen, ihr Verhalten bei Kreuzungen und Transplantationsversuchen. Rev. suisse Zool. **52**, 155—211 (1945). — VISCONTINI, M., M. SCHOELLER, M. LOESER, P. KARRER u. E. HADORN: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Drosophila melanogaster*. Helvet. chim. Acta **38**, 397—401 (1955a). — VISCONTINI, M., E. LOESER, P. KARRER u. E. HADORN: Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster* II. Helvet. chim. Acta **38**, 1222—1224 (1955b). — Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*. III. Helvet. chim. Acta **38**, 2034—2035 (1955c). — VISCONTINI, M., H. SCHMID u. E. HADORN: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Astacus fluviatilis*. Experientia (Basel) **11**, 390 (1955). — WHITING, A. R.: Eye colors in the parasitic wasp *Habrobracon* and their behaviour in multiple recessives and mosaics. J. Genet. **29**, 99—107 (1934).

Prof. Dr. E. HADORN, Zoologisch-vergl.-anatomisches Institut der Universität Zürich

Department of Zoology, Michigan State University

PAPER CHROMATOGRAPHIC STUDIES OF THE EFFECTS OF THE
LOZENGE PSEUDOALLELES ON FREE AMINO ACIDS AND PEPTIDES
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

By

ALLEN S. FOX

With 5 figures in the text

(Eingegangen am 2. Dezember 1955)

Introduction

Immunogenetic studies of *Drosophila melanogaster* have demonstrated that mutants at a number of loci have readily detectable antigenic effects (*cf.* FOX 1949 and BARISH and FOX 1956). In one such case, the antigen so affected was obtained in partially purified form and proved to be protein (FINKELSTEIN and FOX 1953). In other cases, the antigens have been destroyed by heat, precipitated by protein precipitants, and shown to be non-dialyzable, so that it can be concluded that they are undoubtedly proteins. On the basis of the patterns of genic interaction encountered in these cases, and on the basis of a parallel study of the genetic control of the enzyme tyrosinase in strain 15300 of *Neurospora crassa*, it has been suggested that at least heuristic value could be attached to the hypothesis that protein synthesis occurs in two gene-controlled stages: a series of preliminary steps leading to the production of non-specific precursors, and a second stage during which specificity is conferred upon the product (FOX and WHITE 1953 and FOX 1954).

The development of paper chromatographic methods for the separation of amino acids and peptides, and the application of these methods to *Drosophila* (HADORN and MITCHELL 1951 and BUZZATI-TRAVERSO 1953), has afforded a convenient means to obtain further information relative to the above hypothesis. An examination of the distribution of amino acids and peptides in mutants of known antigenic effect could yield information about the possibility that they exert their effects at the level of amino acid and peptide metabolism or at some later stage in protein synthesis. Among mutants with antigenic effects are those at the three pseudoallelic *lozenge* loci; lz^{BS} , lz^{46} , and lz^q (CHOVNICK and FOX 1953). These have been studied in the present investigation.

Materials and methods

The series of co-isogenic stocks derived for the previous immunogenetic studies (CHOVNICK and FOX 1953) were used in this investigation. These stocks all possess autosomes and a Y-chromosome derived from an isogenic Oregon R stock originally developed by Dr. JACK SCHULTZ. The *lozenge* mutants have been inserted into the X-chromosome of this Oregon R stock in all possible combinations, so that the series of stocks probably differ only with respect to the *lozenge* segments of their X-chromosomes. There are eight such X-chromosomes: *Oregon R* (+), lz^{BS} , lz^{46} , lz^q , $lz^{BS} lz^{46}$, $lz^{BS} lz^q$, $lz^{46} lz^q$, and $lz^{BS} lz^{46} lz^q$. These

provide the basis for 44 different genotypes which could be compared: 36 different homozygous and heterozygous female genotypes, and 8 different hemizygous male genotypes. Of these, the 29 different genotypes listed in Table 1 have actually been studied. These were chosen in such a manner as to provide a reasonable basis for predicting the possible outcome among the remaining 15 genotypes.

Flies were prepared for chromatography in the manner described by BUZZATI-TRAVERSO (1953). Cultures were grown on standard cornmeal-agar-molasses medium at 25° C. Since BUZZATI-TRAVERSO had demonstrated changes in fluorescent substances during the first twelve days of adult life but constancy thereafter, all flies were aged for fifteen days before use. Flies were etherized, decapitated, quickly washed in 95% ethanol, and boiled for one minute in distilled water. After removal of adhering water, flies of a single genotype were thoroughly squashed with a glass pestle at the point of origin on sheets of Whatman No. 1 filter paper. The spots were allowed to dry at room temperature and the residual tissues were not removed. Preliminary work disclosed that the best patterns were obtained when six females or eight males were used per spot in one-dimensional chromatography, and eight females or ten males in two-dimensional chromatography. These numbers were adopted as standard. The larger number of males compensates approximately for their lesser dry weight.

Table 1. *Genotypes subjected to chromatographic analysis*

A. *Homozygous females and hemizygous males.*

$+/+$	$+/Y$	$l_zBS\ l_z^{46}/l_zBS\ l_z^{46}$	$l_zBS\ l_z^{46}/Y$
l_zBS/l_zBS	l_zBS/Y	$l_zBS\ l_z^g/l_zBS\ l_z^g$	$l_zBS\ l_z^g/Y$
$l_z^{46}\ l_z^{46}$	$l_z^{46}\ Y$	$l_z^{46}\ l_z^g/l_z^{46}\ l_z^g$	$l_z^{46}\ l_z^g/Y$
l_z^g/l_z^g	l_z^g/Y	$l_zBS\ l_z^{46}\ l_z^g/l_zBS\ l_z^{46}\ l_z^g$	$l_zBS\ l_z^{46}\ l_z^g/Y$

B. *Heterozygous females.*

$l_zBS/+$	$l_zBS\ l_z^{46}/+$	l_zBS/l_z^{46}	$l_zBS/l_zBS\ l_z^{46}\ l_z^g$
$l_z^{46}/+$	$l_zBS\ l_z^g/+$	l_zBS/l_z^g	$l_z^{46}/l_zBS\ l_z^{46}\ l_z^g$
$l_z^g/+$	$l_z^{46}\ l_z^g/+$	l_z^{46}/l_z^g	$l_z^g/l_zBS\ l_z^{46}\ l_z^g$
	$l_zBS\ l_z^{46}\ l_z^g/+$		

Descending chromatography was used throughout and chromatograms were developed at 25° C. Several solvents were tried; the most satisfactory separations of amino acids and peptides were obtained with 80% aqueous phenol and butanol-glacial acetic acid-water in the ratio of 4:1:1. The former was prepared periodically, stored at 5° C in brown bottles, and discarded as soon as the slightest tinge of color was detectable. The latter (BAW) was freshly prepared for each experiment; the three components were poured into a separatory funnel, shaken for about three minutes, and used without separation of phases. One-dimensional chromatograms were developed with phenol for 20 hours or with BAW for 18 hours. Two-dimensional chromatograms were developed first in phenol for 20 hours, dried at room temperature, and then developed in the second direction with BAW for 18 hours. After development, the sheets were dried at room temperature, sprayed with 0.2% ninhydrin in ethanol, and heated at 60° in air for 20 minutes. The patterns were examined immediately and again after 12 hours. A minimum of six one-dimensional chromatograms for each solvent were examined for each genotype, and a similar number of two-dimensional chromatograms were examined for each genotype.

Since hydrolysis of proteins is avoided by these methods, the ninhydrin-positive spots observed on such chromatograms originate as free amino acids, or peptides, or related compounds in the hemolymph or tissues of the thoracic and abdominal regions. The identity of these spots were established by depositing 5–10 μ gm. of particular amino acids (Eastman Kodak Company) on the squashed flies prior to the development of the two-dimensional chromatograms. The spot exhibiting intensified color and increased size was considered identical to the amino acid added in each case. Chromatograms of the amino acids alone were developed as controls. The spots exhibited by all genotypes were subjected to analysis by these means. While absolute identification can be established only by elution and chemical analysis of spots, this method gives results of high certainty.

The size and intensity of spots of the same identity in the various genotypes were visually compared as a measure of possible quantitative differences. Such comparison gives reasonable estimates of the relative amounts of the substance involved in each case (BERRY *et al.* 1951), but the limitations of the method will be discussed below.

Wild type patterns

One-dimensional chromatograms of Oregon R males and females developed in BAW and in phenol are illustrated in Figs. 1 and 2 respectively. The distinguishable spots are encircled and numbered for identification. The points of origin are represented by the dark spot at the base of each chromatogram, and the solvent

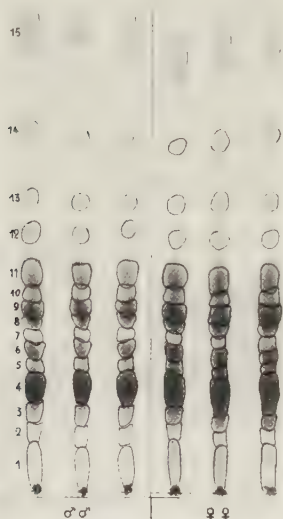


Fig. 1. One-dimensional chromatograms of free ninhydrin-positive substances in decapitated Oregon R males and females. Eight males or six females per chromatogram. Solvent: *n*-butanol, glacial acetic acid, and distilled water in ratio of 4:1:1 by volume. Developed at 25° C for 18 hours



Fig. 2. One-dimensional chromatograms of free ninhydrin-positive substances in decapitated Oregon R males and females. Eight males or six females per chromatogram. Solvent: 80 % aqueous phenol. Developed at 25° C for 20 hours

front is indicated by the transverse line at the top. The close similarity of the chromatograms of any one sex developed with the same solvent is illustrative of the high degree of constancy reported by previous workers: the limits of variability are exhibited by the two phenol chromatograms of females contained in Fig. 2. It may readily be observed that adjacent spots overlap extensively. This observation, added to the incomplete resolution afforded by one-dimensional chromatography (demonstrated below), prevents quantitative comparisons among the various genotypes.

Fifteen spots are distinguishable in BAW chromatograms of both males and females (Fig. 1). The mean *R_f* of each of these spots is given, together with its standard error, in Table 2. While differences in size and intensity of comparable spots in males and females are observable, their colors are in general similar. The same may be said for their *R_f* values. The mean *R_f* values of spots 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, and 14 in males do not differ significantly from the same spots in

females. The difference between the Rf values in males and females is significant at the 1% level for spots 1, 3, 12, and 15, and at the 5% level for spot 8.

In spite of the similarity of patterns exhibited by males and females in BAW chromatograms, their phenol chromatograms are different (Fig. 2). Twelve ninhydrin-positive spots are observable in males, but only eleven in females (note that the spot labeled 9-10 is only one spot in females). The colors of spots 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, and 12 in males are similar to the colors of the corresponding spots in females, although differences in size and intensity are exhibited. There is a striking depression of the Rf values of the spots exhibited by females when compared with the corresponding spots in males (Table 3). This is true of all spots except 1, 2, and 3. Spot 1 exhibits a significantly lower Rf value in males. The Rf values of spots 2, and 3 do not differ significantly in the two sexes.

All of the rest of the spots have (at the 1% level) significantly higher Rf values in males than in females. Spots 9 and 10 in males both have higher Rf values than spot 9-10 in females. Indeed, the systematic reduction of Rf values in females suggests a compaction of ninhydrin-positive materials in phenol chromatograms of females, resulting in the visualization of a smaller number of spots. In particular, it would seem that spots 9 and 10, which are distinguishable in males, overlap so extensively in females that they appear as a single spot (9-10).

That this is the case is demonstrated by two-dimensional chromatography, which moreover demonstrates differences between the sexes that are undetected in one-dimensional chromatograms. Figs. 3 and 4 contain representations of two-dimensional chromatograms of males and females respectively. The number of spots observable in these chromatograms (23 in males and 22 in females) is larger than in one-dimensional chromatograms developed with either solvent alone. This is in agreement with the well-known observation that adequate separation of complex mixtures is frequently difficult or impossible in one-dimensional chromatography.

Table 2. *Free ninhydrin-positive substances observed in one-dimensional chromatograms of decapitated Oregon R males and females developed in BAW*

Spot No.	Males		Females	
	N	Mean Rf \pm SE	N	Mean Rf \pm SE
1	22	0.051 \pm 0.002	15	0.061 \pm 0.002
2	22	0.112 \pm 0.002	15	0.115 \pm 0.002
3	22	0.149 \pm 0.002	15	0.143 \pm 0.002
4	22	0.209 \pm 0.003	15	0.208 \pm 0.002
5	22	0.252 \pm 0.003	15	0.257 \pm 0.003
6	22	0.279 \pm 0.002	15	0.281 \pm 0.002
7	22	0.305 \pm 0.003	15	0.301 \pm 0.002
8	22	0.326 \pm 0.002	15	0.319 \pm 0.002
9	22	0.354 \pm 0.002	15	0.351 \pm 0.002
10	22	0.387 \pm 0.002	15	0.388 \pm 0.003
11	22	0.430 \pm 0.003	15	0.427 \pm 0.003
12	22	0.507 \pm 0.003	15	0.496 \pm 0.002
13	22	0.575 \pm 0.003	15	0.568 \pm 0.002
14	22	0.694 \pm 0.004	15	0.687 \pm 0.002
15	22	0.892 \pm 0.003	15	0.875 \pm 0.003

Table 3. *Free ninhydrin-positive substances observed in one-dimensional chromatograms of decapitated Oregon R males and females developed in 80% phenol*

Spot No.	Males		Females	
	N	Mean Rf \pm SE	N	Mean Rf \pm SE
1	49	0.084 \pm 0.002	27	0.100 \pm 0.003
2	49	0.166 \pm 0.003	27	0.168 \pm 0.003
3	49	0.210 \pm 0.004	27	0.213 \pm 0.002
4	49	0.286 \pm 0.002	26	0.269 \pm 0.003
5	49	0.324 \pm 0.002	27	0.301 \pm 0.003
6	49	0.358 \pm 0.002	27	0.337 \pm 0.003
7	49	0.525 \pm 0.002	27	0.487 \pm 0.005
8	49	0.604 \pm 0.003	27	0.567 \pm 0.005
9	49	0.659 \pm 0.004	27	0.626 \pm 0.007
10	48	0.689 \pm 0.004		
11	49	0.759 \pm 0.005	27	0.676 \pm 0.009
12	49	0.822 \pm 0.006	27	0.747 \pm 0.008

The more adequate resolution afforded by two-dimensional chromatography allows for the qualitative identification of the substances responsible for single spots by means of the method outlined above. 18 of the substances, found in both sexes, have been identified as amino acids or related compounds; the identity of each is indicated in the figures. Of these, only the identities of spots 12 and 22 cannot be uniquely specified. Spot 12 is produced either by histidine, or by arginine, or by both. Spot 22 consists of one or more of leucine, isoleucine, and norleucine.

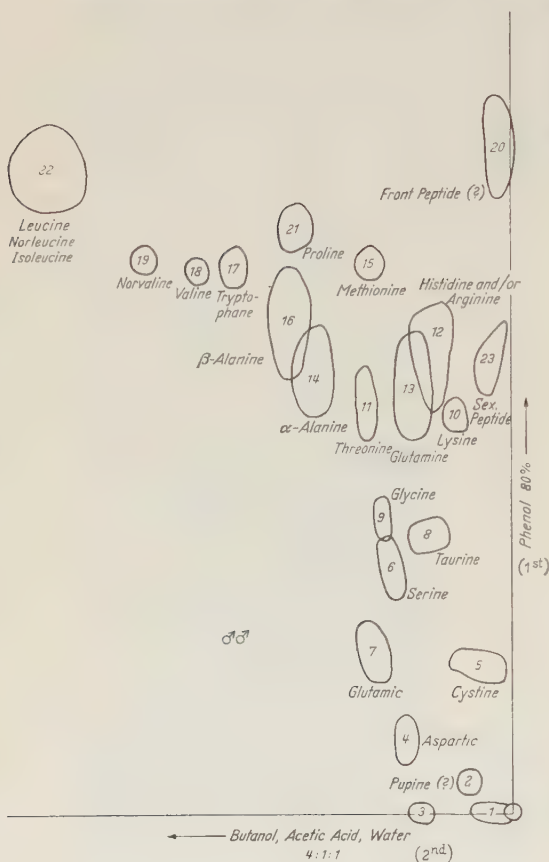


Fig. 3

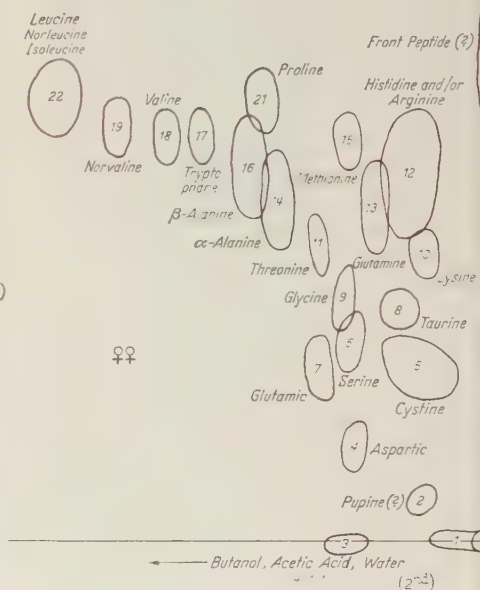


Fig. 4

Fig. 3. Two-dimensional chromatogram of free ninhydrin-positive substances in ten decapitated Oregon R males. 1st solvent: 80% aqueous phenol for 20 hours at 25°C. 2nd solvent: *n*-butanol, glacial acetic acid, and distilled water (4:1:1 by volume) for 18 hours at 25°C.

Fig. 4. Two-dimensional chromatogram of free ninhydrin-positive substances in eight decapitated Oregon R females. Development as in Fig. 3.

Many of these substances have been reported by previous workers. Thus, HADORN (1954) reports that STUMM-ZOLLINGER has identified the following in the two-dimensional chromatograms of unhydrolyzed hemolymph of wild and *lethal-translucida* larvae developed, however, in different solvents than those used in the present work: aspartic acid, cystine, glutamic acid, serine and glycine (together in one spot), ornithine and lysine (together in one spot), threonine, glutamine, α -alanine, β -alanine, histidine, valine, proline, and leucine (or isoleucine). Of these, we find no ornithine; as may be seen in Fig. 5, the spot produced by the addition of ornithine corresponds to none of the spots normally

found in imagoes. The omission of arginine from the list presented by HADORN may be due to the same reason that causes us to be uncertain about its presence, namely the inability to distinguish it from histidine. The same comment applies to norleucine, which is not easily separated from leucine and isoleucine. Beyond this, we definitely find norvaline, taurine, methionine, and tryptophane, none of which is reported by HADORN. MICKS and ELLIS (1951), however, report arginine, taurine, methionine, and tryptophane in non-protein extracts of adult mosquitoes of several genera.

Besides the 18 identified substances, spots 1, 2, 3, and 20 appear to be qualitatively identical in the two sexes. Spot 2 may be the substance which HADORN and MITCHELL (1951) have entitled pupine and demonstrated to be a peptide. Spot 20 may be the same as their "front peptide". Spots 1 and 3 are unidentified, but are probably peptides.

Spot 23 is observed only in males. Elution of this substance followed by acid hydrolysis yields two or three ninhydrin-positive products. The small amount of material available for analysis has prevented identification of these products, but they are undoubtedly amino acids. The male specific substance has therefore been entitled the "sex peptide". This is the only qualitative difference between the sexes which has been observed among ninhydrin-positive substances. Quantitative differences exist, however, and have been discussed in a separate paper (FOX 1956a).

Tables 4 and 5 contain, for males and females respectively, the R_f values in each of the two solvents of the spots observed on two-dimensional chromatograms. The most striking feature of these data are the different R_f values exhibited by males and females. These differences are similar to those observed in one-dimensional chromatography, but in this case involve substances of established qualitative identity in the two sexes. The differences and their probabilities of occurrence by chance are listed in Table 6. In phenol, the R_f values exhibited by females are systematically lower than in males, the differences being insignificant only for spots with the lowest R_f 's. In BAW the trend is reversed, exhibiting a systematic depression in males except for those spots with higher R_f values.

The causes of these differences in males and females of R_f values of substances of established chemical identity are not definitely ascertained, but are probably attributable to the effects of admixtures of different relative concentrations in the two sexes and possibly to differences in such factors as salt concentrations (*cf.* BLOCK, LE STRANGE, and ZWEIG 1952 and BERRY *et al.* 1951). That this is the case is indicated by the observation that the R_f 's in phenol of pure single

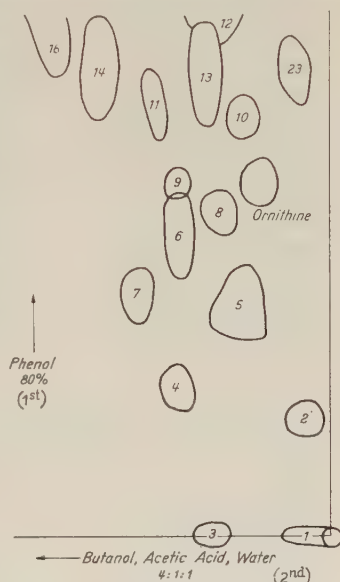


Fig. 5. Section of two-dimensional chromatogram of Oregon R males to which ornithine has been added. Note lack of correspondence with any of free ninhydrin-positive substances normally found

Table 4. *Free ninhydrin-positive substances observed in two-dimensional chromatograms of decapitated Oregon R males developed in 80% phenol and butanol, acetic acid, water (4:1:1)*

Spot No.	Identity	No. Determinations	Solvent	
			Phenol Mean Rf \pm SE	BAW Mean Rf \pm SE
1	Unknown	8	0	0.029 \pm 0.002
2	Pupine (?)	7	0.045 \pm 0.004	0.039 \pm 0.005
3	Unknown	8	0	0.089 \pm 0.005
4	Aspartic	8	0.096 \pm 0.006	0.116 \pm 0.003
5	Cystine	14	0.197 \pm 0.003	0.043 \pm 0.004
6	Serine	8	0.289 \pm 0.020	0.121 \pm 0.005
7	Glutamic	8	0.204 \pm 0.004	0.153 \pm 0.004
8	Taurine	13	0.331 \pm 0.007	0.082 \pm 0.004
9	Glycine	8	0.348 \pm 0.004	0.135 \pm 0.004
10	Lysine	7	0.463 \pm 0.010	0.055 \pm 0.005
11	Threonine	8	0.499 \pm 0.001	0.155 \pm 0.004
12	Histidine and/or Arginine	8	0.573 \pm 0.009	0.080 \pm 0.004
13	Glutamine	8	0.512 \pm 0.007	0.103 \pm 0.003
14	α -Alanine	8	0.535 \pm 0.032	0.221 \pm 0.006
15	Methionine	8	0.670 \pm 0.008	0.137 \pm 0.007
16	β -Alanine	8	0.601 \pm 0.008	0.249 \pm 0.003
17	Tryptophane	8	0.675 \pm 0.012	0.308 \pm 0.004
18	Valine	8	0.676 \pm 0.006	0.356 \pm 0.005
19	Norvaline	8	0.698 \pm 0.012	0.420 \pm 0.007
20	Front Peptide (?)	7	0.797 \pm 0.021	0.003 \pm 0.003
21	Proline	8	0.736 \pm 0.011	0.234 \pm 0.003
22	Leucines	8	0.815 \pm 0.014	0.534 \pm 0.008
23	Sex Peptide	8	0.530 \pm 0.003	0.014 \pm 0.004

Table 5. *Free ninhydrin-positive substances observed in two-dimensional chromatograms of decapitated Oregon R females developed in 80% phenol and butanol, acetic acid, water (4:1:1)*

Spot No.	Identity	No. Determinations	Solvent	
			Phenol Mean Rf \pm SE	BAW Mean Rf \pm SE
1	Unknown	6	0	0.036 \pm 0.002
2	Pupine (?)	6	0.045 \pm 0.003	0.066 \pm 0.002
3	Unknown	6	0	0.122 \pm 0.005
4	Aspartic	6	0.103 \pm 0.005	0.141 \pm 0.004
5	Cystine	12	0.194 \pm 0.006	0.074 \pm 0.005
6	Serine	6	0.253 \pm 0.010	0.147 \pm 0.003
7	Glutamic	6	0.202 \pm 0.007	0.176 \pm 0.005
8	Taurine	10	0.290 \pm 0.005	0.098 \pm 0.003
9	Glycine	6	0.310 \pm 0.013	0.158 \pm 0.004
10	Lysine	6	0.378 \pm 0.014	0.074 \pm 0.005
11	Threonine	6	0.413 \pm 0.016	0.179 \pm 0.004
12	Histidine and/or Arginine	6	0.470 \pm 0.014	0.088 \pm 0.004
13	Glutamine	6	0.451 \pm 0.010	0.127 \pm 0.003
14	α -Alanine	6	0.455 \pm 0.016	0.228 \pm 0.004
15	Methionine	6	0.532 \pm 0.017	0.150 \pm 0.006
16	β -Alanine	6	0.501 \pm 0.018	0.259 \pm 0.005
17	Tryptophane	6	0.543 \pm 0.021	0.307 \pm 0.006
18	Valine	6	0.550 \pm 0.023	0.345 \pm 0.007
19	Norvaline	6	0.569 \pm 0.027	0.399 \pm 0.008
20	Front Peptide (?)	6	0.644 \pm 0.021	0
21	Proline	6	0.594 \pm 0.021	0.250 \pm 0.006
22	Leucines	6	0.639 \pm 0.034	0.495 \pm 0.006

amino acids in our control two-dimensional chromatograms, and reported by other workers (CONSDEN, GORDON and MARTIN 1944), are larger than in males or females.

Table 6. *Differences in R_f values of ninhydrin-positive substances in two-dimensional chromatograms of decapitated Oregon R males and females*

Spot No.	Identity	Solvent			
		Phenol		BAW	
		Difference ($\delta - \gamma$)	P	Difference ($\delta - \gamma$)	P
1	Unknown	0		-0.007	0.02—0.05
2	Pupine(?)	0		-0.027	<0.001
3	Unknown	0		-0.033	<0.001
4	Aspartic	-0.007	0.40	-0.025	<0.001
5	Cystine	0.003	0.06—0.70	-0.031	<0.001
6	Serine	0.036	0.10—0.20	-0.026	<0.001
7	Glutamic	0.002	0.80—0.90	-0.023	0.001—0.01
8	Taurine	0.041	<0.001	-0.016	0.001—0.01
9	Glycine	0.038	0.01—0.02	-0.023	<0.001
10	Lysine	0.085	<0.001	-0.019	0.02
11	Threonine	0.086	<0.001	-0.024	<0.001
12	Histidine and/or Arginine	0.103	<0.001	-0.008	0.02—0.03
13	Glutamine	0.061	<0.001	-0.024	<0.001
14	α -Alanine	0.080	0.02—0.05	-0.007	0.30—0.40
15	Methionine	0.138	<0.001	-0.013	0.10—0.20
16	β -Alanine	0.100	<0.001	-0.010	0.10—0.20
17	Tryptophane	0.132	<0.001	0.001	0.80—0.90
18	Valine	0.126	<0.001	0.011	0.20—0.30
19	Norvaline	0.129	<0.001	0.021	0.05—0.10
20	Front Peptide(?)	0.153	<0.001	0.003	0.30—0.40
21	Proline	0.152	<0.001	-0.016	0.02—0.05
22	Leucines	0.176	<0.001	0.039	0.001—0.01

The presence of the sex peptide in males but not in females is almost certainly not responsible for the larger number of spots observed in one-dimensional, phenol chromatograms of males. On the basis of its phenol R_f on two-dimensional chromatograms, the sex peptide is included in spot 7 of the one-dimensional chromatograms along with lysine, threonine, glutamine, and α -alanine. Spots 9 and 10 in one-dimensional, phenol chromatograms, the separateness of which is responsible for the larger number of spots in males, probably consist of methionine, tryptophane, valine, and norvaline. The first three are concentrated largely in spot 9 with the latter located largely in spot 10, although considerable overlap is probable. As suggested above, the systematic depression of phenol R_f values in females probably accounts for their amalgamation into a single spot in that sex.

These considerations emphasize the inadequacy of resolution, resulting in the production of actual artifacts in some cases, in one-dimensional chromatography of material such as this. The consequences of this conclusion for the application of chromatographic methods to problems of taxonomy and population genetics have been discussed elsewhere (Fox 1956b).

Patterns of *lozenge* genotypes

Two-dimensional chromatograms of flies of the genotypes listed in Table 1 were compared with each other in order to detect effects of the *lozenge* mutants on ninhydrin-positive substances. The qualitative results of this comparison are easily stated. Males of all genotypes exhibited the same chromatographic pattern as has been described for Oregon R males: all exhibited 23 ninhydrin-positive

spots, the qualitative identity and Rf values of which proved the same as in Oregon R males. Similarly, females of all genotypes, homozygous or heterozygous, exhibited the same chromatographic pattern: 22 spots were present in all, and these exhibited the same Rf values and qualitative identities as in Oregon R females. The *lozenge* mutants therefore, have no qualitative effects on the amino acids and peptides detected in this manner.

Careful visual comparisons of the size and intensity of spots were made in an examination of possible quantitative effects. A minimum of six chromatograms of each mutant male genotype were compared with a similar number of Oregon R male chromatograms developed at the same time. The size of spots was compared by overlap; the intensity was subjected to side-by-side comparison under constant illumination. While minor fluctuation in size and intensity was observable among chromatograms of any one genotype, no spot showed consistent deviation in one direction from wild type in any of the mutant males. Similar comparisons of homozygous mutant and heterozygous females with Oregon R females yielded similar results. Thus, no quantitative effects of the *lozenge* mutants on amino acids and peptides were detected.

The sensitivity of this method of quantitative comparison is surprisingly good. In experiments with the amino acid tyrosine, it has been found possible to detect consistent differences in the size and intensity of spots produced by amounts differing by as little or less than 2 $\mu\text{gm.}$ (FOX and BURNETT, unpublished). Other workers report similar results (BERRY *et al.* 1951). In the present instance, it would seem conservative to estimate that differences of the order of 5 $\mu\text{gm.}$, or approximately 0.5 $\mu\text{gm.}$ per fly, would have been detected. It seems unlikely that densitometry or colorimetry would have yielded greater refinement.

Discussion

It is not surprising, perhaps, that no qualitative differences in free amino acids have been found among the genotypes examined. *Drosophila* is an holozoic organism, incapable of synthesizing many of the amino acids detected in this work (SCHULTZ *et al.* 1946 and HINTON *et al.* 1951). Grown on a complex, chemically undefined, "complete" medium, as in the present case, it may be capable of deriving all of its amino acids from its environment. Under these circumstances, even mutations conferring upon the organism an additional incapability of synthesizing one or more amino acids might have no qualitative effects; if the organism were incapable of remedying the situation through the use of exogenous amino acids, the effect would probably be one of early lethality and therefore go undetected in work of this sort.

Alterations in amino acid or peptide metabolism, resulting from genic substitution, might nevertheless be expected to have quantitative consequences. The present instance, known to be one in which the mutants have effects on the antigenic specificity of proteins, would appear to be a favorable one for the detection of such consequences. Quantitative differences may have been overlooked, due either to their small size or to limitation to earlier developmental stages. However, within the limitations of this work they have not been found.

A case similar to the present one concerns the effects of the eye-color mutant *a* in *Ephesia* (CASPARI 1946 and 1950). The mutant is characterized by increased

tryptophane content, but little or none of the increase is in free tryptophane. Instead, there is a marked increase in protein tryptophane, and a concomitant change in antigenic specificity. The eye-color effect is the result of the failure of the oxidation of tryptophane to kynurenine but, as pointed out by CASPARI, this need not be the result of an inhibition of the oxidative process. It seems more probable that the effect of the genic substitution is on protein structure causing a secondary deficiency of tryptophane for kynurenine production.

The *vermilion* mutants in *Drosophila melanogaster*, on the other hand, appear to produce their eye-color effects by rendering flies incapable of carrying out the oxidation of tryptophane to kynurenine (GREEN 1949). In this case, there is a marked increase of free tryptophane, but no significant effect on protein tryptophane. Furthermore, the antigenic effects of these mutants seem not to involve the same metabolic pathway as that responsible for the tryptophane and eye-color effects (BARISH and FOX 1956). A similar case is that of phenylketonuria in man, which probably involves an inability to convert phenylalanine to tyrosine (HARRIS 1953). The metabolic disturbance results in an accumulation of phenylpyruvic acid and phenylalanine in urine and blood plasma, but the amino acid composition of proteins is not affected (BLOCK *et al.* 1940). There has been no examination, however, of the antigenic specificity of these proteins.

A serious shortcoming of all of this work, including the present case, is its static nature. Any examination of the question of the genetic control of protein synthesis must certainly take into account the dynamic state which such body constituents exhibit in living cells (SCHOENHEIMER 1942). Nevertheless, it is encouraging to note that dynamic studies have indicated that amino acid incorporation into proteins in animal tissues is not dependent on the presence of all the other amino acids or on the nutritional state of the animal (BORSOOK 1952). Under certain experimental conditions the evidence indicates that amino acids are incorporated independently of each other, both in fast and slow reacting tissues. It might thus be expected that a change in concentration of one amino acid need not result in a change in protein constitution, and changes in protein constitution need not be accompanied by changes in amino acid concentrations.

It seems profitable to propose, therefore, that genes which affect protein structure and specificity on holozoic organisms do not do so by affecting the metabolism of amino acids and small peptides. In terms of the hypothesis outlined in the introduction, this suggestion would imply that such effects are confined to the "second stage" of protein synthesis. In the light of the work of BORSOOK (1952) and his associates, further specification is perhaps possible. These workers have demonstrated that radioactive amino acids are very rapidly incorporated by liver slices and homogenates into fairly large polypeptides, followed by a much slower transfer to tissue proteins. STEINBERG and ANFINSEN (1952) report similar results. Genes of the present sort might be concerned with the latter process, as might also be true of the genes responsible for the hemoglobin variants in man (literature in HARRIS, 1953, and ALLISON 1955). It might further be suggested that genic alterations resulting in metabolic disabilities during the earlier stage could well result in irreparable effects and lethality. The mutant *l^hetal-translucida* in *Drosophila* (HADORN 1954) could be a case of this sort, although the possibility that it results in abnormal protein degradation is not excluded.

Needless to say, these suggestions are highly tentative. More recently, for example, BORSOOK (1953) reports results which are taken to indicate the direct exchange of individual free amino acids with their counterparts in protein without the intervention of peptide intermediates. Peptide intermediates seem also not to be involved in protein synthesis during enzyme adaptation in microorganisms (SPIEGELMAN and HALVORSON 1953). This question seems not to be settled, however, and future advances in the understanding of the genetic control of protein synthesis will demand elucidation of the biochemical mechanisms involved.

Summary

1. One- and two-dimensional chromatography of free ninhydrin-positive materials in decapitated imagoes of *Drosophila melanogaster* is described.

2. One-dimensional chromatography is demonstrated to provide inadequate resolution, to obscure differences among genotypes in some cases, and to result in artifactual differences in others.

3. Two-dimensional chromatography demonstrates 18 free amino acids and related compounds in both males and females: aspartic acid, cystine, serine, glutamic acid, taurine, glycine, lysine, threonine, histidine and/or arginine, glutamine, α -alanine, methionine, β -alanine, tryptophane, valine, norvaline, proline, and the leucines (leucine, isoleucine, norleucine). Four additional substances, probably peptides, are present in both sexes. Males possess a peptide (the "sex peptide") which is absent in females.

4. Systematic differences between the sexes of Rf values of identified substances are observed. These are probably attributable to the affects of admixture.

5. Effects of the *lozenge* pseudoalleles on free amino acids and peptides are studied by comparing two-dimensional chromatograms of *Oregon R* (wild) males and females with those of lz^{BS} , lz^{46} , and lz^a hemizygous males and homozygous and heterozygous females. In all, 29 genotypes are studied.

6. Neither qualitative nor quantitative effects of the *lozenge* mutants on free amino acids and peptides are detected.

7. Since the *lozenge* mutants are known to affect the antigenic specificity of proteins, it is suggested that they do not do so by affecting the metabolism of amino acids and peptides. Other cases are examined in the light of these findings, and problems of the genetic control of protein synthesis and specificity in holozoic organisms are briefly discussed.

Note added in proof

Two recent papers by CHEN and HADORN¹ report the presence of methionine, tyrosine, and γ -aminobutyric acid in body-extracts and hemolymph of larvae of *Drosophila melanogaster*, but report no ornithine, tryptophane, taurine, or norvaline. Their findings with regard to methionine and ornithine agree with this report. Our failure to find γ -aminobutyric acid in imagoes may be a reflection of an age difference, since STUMM-ZOLLINGER² could find this sub-

¹ CHEN and HADORN: Rev. suisse Zool. **61**, 437 (1954); **62** 338 (1955).

² STUMM-ZOLLINGER: Z. Vererbungsl. **86**, 126 (1954).

stance only occasionally in prepupae. The absence of tyrosine from our chromatograms was demonstrated in the same manner as that of ornithine (see above). The identification methods utilized by CHEN and HADORN may possibly have led to a confusion of tyrosine and tryptophane.

CHEN and HADORN also report the presence of four peptides (P_1 , P_2 , P_3 , and P_4), as did STUMM-ZOLLINGER. Their P_2 probably corresponds to our spot 2, and P_1 may correspond to spots 1 and 3. Their P_3 occupies a position on chromatograms similar to that occupied by our spot 8, which we have identified as taurine. P_4 occupies a position similar to that of spot 5, which we have identified as cystine. STUMM-ZOLLINGER further reports that cystine and P_4 travel together. Since we did not attempt hydrolysis of spots 5 and 8 our identifications may be erroneous and they may well correspond to P_4 and P_3 respectively.

Acknowledgements. Part of this work was performed while the author was a Fulbright Research Professor at the Institute of Genetics, University of Pavia. The author expresses his sincerest gratitude to Professor A. A. BUZZATI-TRAVERSO, Director of the Institute, to Professor G. E. MAGNI, Acting Director, and to Dr. R. E. SCOSSIOLOI for their splendid hospitality. Miss M. MORONE, Miss I. E. RASMUSSEN, and Mr. R. O. WOLF provided invaluable technical assistance at different times during the course of the work. The work was also supported by research grants from the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, U.S.A. (Grant No. C-2440), and from the American Cancer Society upon recommendation of the Committee on Growth of the National Research Council (U.S.A.).

Literature cited

- ALLISON, A. C.: Notation for hemoglobin types and genes controlling their synthesis. *Science* (Lancaster, Pa.) **122**, 640 (1955). — BARISH, N., and A. S. FOX: Immunogenetic studies of pseudoallelism in *Drosophila melanogaster*. II. Antigenic effects of the vermilion pseudoalleles. *Genetics* **41**, 45 (1956). — BERRY, H. K., H. E. SUTTON, L. CAIN and J. S. BERRY: Development of paper chromatography for use in the study of metabolic patterns. *Univ. Texas Publ. No. 5109*, 22 (1951). — BLOCK, R. J., G. A. JERVIS, D. BOLLING and M. WEBB: Chemical and metabolic studies on phenylalanine; amino acid content of tissue proteins of normal and phenylpyruvic oligophrenic individuals. *J. of Biol. Chem.* **134**, 567 (1940). — BLOCK, R. J., R. LE STRANGE and G. ZWEIG: Paper chromatography. New York: Academic Press 1952, 195 pp. — BORSOOK, H.: The biosynthesis of proteins and peptides, including isotopic tracer studies. *Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe* **9**, 292 (1952). — Peptide bond formation. *Adv. Protein Chem.* **8**, 127 (1953). — BUZZATI-TRAVERSO, A. A.: Paper chromatographic patterns of genetically different tissues: a contribution to the biochemical study of individuality. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **39**, 376 (1953). — CASPARI, E.: On the effects of the gene *a* on the chemical composition of *Ephesia kuehniella* Zeller. *Genetics* **31**, 454 (1946). — Serological differences between *a*⁺*a*⁺ and *aa* *Ephesia*. *Genetics* **35**, 100 (1950). — CHOVNICK, A., and A. S. FOX: Immunogenetic studies of pseudoallelism in *Drosophila melanogaster*. I. Antigenic effects of the lozenge pseudoalleles. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **39**, 1035 (1953). — CONSDEN, R., A. H. GORDON and A. J. P. MARTIN: Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.* **38**, 224 (1944). — FINKELSTEIN, P., and A. S. FOX: Partial chemical isolation and characterization of antigen I. *Genetics* **38**, 166 (1953). — FOX, A. S.: Immunogenetic studies of *Drosophila melanogaster*. II. Interaction between the *rb* and *v* loci in the production of antigens. *Genetics* **34**, 647 (1949). — Protein synthesis and genetics. *Nature* (Lond.) **173**, 350 (1954). — Chromatographic differences between males and females in *Drosophila melanogaster* and the role of the X and Y chromosomes. *Physiologic. Zool.* (1956a). — The application of paper chromatography to taxonomic studies. *Science* (Lancaster, Pa.) **123**, 143 (1956b). — FOX, A. S., and T. B. WHITE: Immunogenetic studies of *Drosophila melanogaster*. III. Further evidence of genic interaction in the determination of antigenic specificity. *Genetics* **38**, 152 (1953). — GREEN, M. M.: A study of tryptophane in eye color mutants of *Drosophila*. *Genetics* **34**, 564 (1949). —

HADORN, E.: Approaches to the study of biochemical and developmental effects of mutations. Proc. Ninth Int. Congr. Gen. Caryologia (Firenze) Suppl. **6**, 326 (1954). — HADORN, E., and H. K. MITCHELL: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **37**, 650 (1951). — HARRIS, H.: An Introduction to Human Biochemical Genetics. Eugenics Laboratory Memoirs, 37. London: Cambridge Univ. Press 1953. 96 pp. — HINTON, T., D. T. NOYES and J. ELLIS: Amino acids and growth factors in a chemically defined medium for *Drosophila*. Physiologic. Zool. **24**, 335 (1951). — MICKS, D.W., and J. P. ELLIS: Free amino acids in adult mosquitoes. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **78**, 69 (1951). — SCHOENHEIMER, R.: The Dynamic State of Body Constituents. Edward K. Dunham Lectures. Cambridge, Mass.: Harvard Univ. Press 1942. — SCHULTZ, J., P. ST. LAWRENCE and D. NEWMAYER: A chemically defined medium for the growth of *Drosophila melanogaster*. Anat. Rec. **96**, 540 (1946). — SPIEGELMAN, S., and H. O. HALVORSON: The nature of the precursor in the induced synthesis of enzymes. Symposia Soc. Gen. Microbiol. **3**, 98 (1953). — STEINBERG, D., and C. B. ANFINSEN: Evidence for intermediates in ovalbumen synthesis. J. of biol. Chem. **199**, 25 (1952).

Professor ALLEN S. FOX, Department of Zoology, Michigan State University,
East Lansing, Michigan, U.S.A.

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Mainz *

ÜBER AUSBILDUNG UND VERERBUNG DER KÖRPERFARBE
BEI *GAMMARUS PULEX* SSP. *SUBTERRANEUS* (SCHNEIDER).
EINER NORMALERWEISE PIGMENTLOSEN HÖHLENFORM
DES GEMEINEN BACHFLOHKREBSSES

Von

FRITZ ANDERS

(Eingegangen am 26. März 1956)

A. Einleitung

In einer allgemeinen evolutionsgenetischen Erörterung des Höhlentierproblems teilte DE LATTIN (1939) folgende Gelegenheitsbeobachtung an dem gemeinen Bachflohkrebs *Gammarus pulex* (L.) mit:

Setzt man die in Erzbergwerken des Harzes lebenden farblosen Flohkrebse der ssp. *subterraneus* „wenige Wochen dem Licht aus, so beginnt der größte Teil von ihnen Pigment auszubilden. Das Erstaunliche dabei ist aber, daß nur ein Bruchteil von ihnen nachher die normale, von der oberirdischen Form her bekannte Wildfarbe zeigt, während bei dem Rest ganz abnorme Färbungen auftreten, die bei oberirdischen Populationen meines Wissens noch nicht beobachtet wurden. Diese Tiere zeigen nämlich dann entweder eine leuchtend rosa oder eine schöne violettblaue Farbe. Ein kleiner Teil hält auch seine Farblosigkeit bei.“

Zweck der vorliegenden Untersuchungen war es nun, einmal diese Beobachtung an einem größeren Tiermaterial unter kontrollierten Laboratoriumsbedingungen zu erhärten, vor allen Dingen aber die von DE LATTIN ausgesprochene Vermutung, es handele sich bei den Farbtypen um erbliche Unterschiede, zu prüfen. Bei der Bearbeitung der zuletzt genannten Frage ergaben sich dann unerwartet Komplikationen. Es zeigte sich nämlich, daß eine Reinzucht dieser Farbtypen nur mit größten Schwierigkeiten verbunden und oft sogar unmöglich ist, da hierbei die Geschlechterverteilung nur sehr selten dem zu erwartenden 1:1-Verhältnis entspricht und oft so stark davon abweicht, daß für die entsprechenden Paarungen entweder keine ♀♀ oder keine ♂♂ zur Verfügung standen. Die genetischen Untersuchungen, die anfänglich mit rein evolutionistischer Zielsetzung begonnen wurden, ergaben dann auch sehr bald, daß *Gammarus pulex* außerdem ein besonders günstiges Objekt für das Studium der Geschlechtsvererbung ist. Hier soll zunächst nur die erbliche Bedingtheit der beobachteten Farbtypen besprochen werden. Bei der engen Verflechtung von Farbgen-Manifestation und Geschlechtsbestimmung, die sich im Verlaufe der Untersuchungen abzeichnete, ist allerdings eine strenge Trennung nicht immer möglich und gelegentlich müssen deshalb auch Befunde über die geschlechtsbeeinflussende Wirkung der Farbfaktoren einbezogen werden. Jedoch soll auf diese und die übrigen evolutionsgenetischen Untersuchungen an anderer Stelle eingegangen werden.

* D 77.

B. Material und Technik

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten Flohkrebse (*Gammarus pulex*) aus vier getrennten Populationen der cavernicolen ssp. *subterraneus* (SCHNEIDER), die ich im Erzbergwerk Grund der Harzer Berg- und Hüttenwerke gefangen habe. Ihre Fundstellen können von der Grube „Hülfe Gottes“ (Bad Grund) aus am leichtesten erreicht werden. — Hinsichtlich der morphologischen Rassenmerkmale sowie der historisch nachweisbaren Erstbesiedlung der Bergwerkstollen durch die Art sei auf die Darstellungen von SCHNEIDER (1885) und MÜHLMANN (1938) verwiesen.

Im folgenden werden die Populationen nach den Stollen benannt, in denen sie gefunden wurden: 1. Population 11. Sohle A; 2. Population 11. Sohle B; 3. Population 13. Sohle; 4. Population Ernst-August-Stollen. Zum Vergleich wurden drei normale oberirdische Populationen von *Gammarus pulex pulex* L. aus Quellen der näheren Umgebung von Mainz herangezogen.

Der Transport der an sich sehr empfindlichen Tiere verläuft auch über weitere Strecken fast ohne Verluste, wenn man diese in offenen Eimern transportiert und ihnen statt des Wassers lediglich einen tiefend nassen Tafelschwamm gibt. Sie verkriechen sich dann in dessen Poren, wo sie vor jeder mechanischen Beschädigung geschützt sind und wo ihnen ausreichend sauerstoffhaltiges Wasser zur Verfügung steht.

Als Bewohner fließenden klaren Bergwassers sind die Versuchstiere — was Temperatur, Sauberkeit und Sauerstoffgehalt des Wassers anbetrifft — in der Kultur äußerst anspruchsvoll. Trotzdem lassen sie sich aber bei sorgfältiger Pflege ohne nennenswerte Verluste züchten. Da jedoch bei diesen Untersuchungen umfangreiche Zuchten notwendig waren, konnten nicht alle mit derselben Sorgfalt gepflegt werden. Gelegentlich mußte deshalb mit größeren Ausfällen gerechnet werden, die allerdings — wenn sie eintraten — weniger einzelne Individuen betrafen, sondern meist ganze Zuchten umfaßten.

Zur Kultur der Tiere dienten Einmachgläser, die stets mit Quellwasser gefüllt wurden. Ferner wurde frischer, nicht faulender, aus Blattresten und anderem Detritus bestehender Schlamm zugegeben, der besonders bei Jungtieren die hauptsächlichste Nahrungsquelle darstellt. Die älteren Tiere wurden im allgemeinen mit rohen Kartoffelstücken gefüttert. Mit dieser Methode wurden stets befriedigende Zuchtergebnisse erzielt. Daß alle bisherigen Versuche einer planmäßigen Zucht (vgl. die Angaben von WAGLER 1937, HAEMPEL 1908, HEINZE 1932) gescheitert sind, dürfte daran liegen, daß von diesen Autoren kein Schlamm in die Zuchtgefäße gegeben wurde. Die vielfach empfohlene Haltung in fließendem Wasser ist dagegen überflüssig; künstliche Belüftung ist zwar empfehlenswert, aber nur in dichtbesetzten Zuchtgefäßen notwendig. — Den relativ hohen Temperaturen des unterirdischen Biotops entsprechend (MÜHLMANN 1938) erfolgte die Zucht bei etwa 17—18° C.

C. Die Farbvariabilität der Wildpopulationen

Der oberirdisch lebende gemeine Bachflohkrebs zeichnet sich normalerweise durch eine hellere oder dunklere olivbraune Körperfarbe aus. Das Pigment selbst liegt — wohl als Chromoproteid — größtenteils im subepidermalen Gewebe. Unabhängig hiervon liegen im Bindegewebe intensiv rot gefärbte Fetttröpfchen, die hauptsächlich Leberschläuche und Insertionsstellen der Muskulatur umgeben. Nach eingehenderen Untersuchungen von BEATTY (1948) besteht das Pigment aus einer Anzahl von verschiedenen Carotinoiden, die wohl stets pflanzlichen Ursprungs sind¹. Schon aus diesem Grunde kann keine ausgesprochene Konstanz der Pigmentierungsintensität erwartet werden, und so findet man auch, daß die Körperfarbe keineswegs so einheitlich ist, wie es bei flüchtigem Anblick zunächst erscheinen mag. Es können vielmehr schon hier alle Übergänge von einem dunkleren oder helleren Olivbraun bis zu einem intensiven Olivgrün beobachtet werden. Trotz dieser nicht unbedeutenden Variabilität sind jedoch die Unter-

¹ Über die Pigmente im Auge von *Gammarus pulex* vgl. MICHEL und ANDERS (1954) und ANDERS (1955).

schiede in ihrer Gesamtheit nicht sehr auffallend, zumal sie meistens wohl mehr die Intensität der Färbung als deren Qualität betreffen.

Die ssp. *subterraneus* ist nun in ihrer Färbung von diesen oberirdischen Tieren grundsätzlich verschieden. So berichtet schon SCHNEIDER, der erste Untersucher des „unterirdischen Gammarus von Klausthal“, hierüber folgendes: „Der subterranean völlig akkommodierte Gammarus entbehrt jeden Pigments, erscheint daher völlig bleich und gerade so durchsichtig milchweiß wie *Gammarus puteanus*¹“.

Tatsächlich erscheinen die Flohkrebse in den Populationen der 11. und 13. Sohle beim flüchtigen Anblick zunächst pigmentlos. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich jedoch, daß in Wirklichkeit nur wenige Individuen völlig farblos, d. h. transparent wie etwa *Niphargus puteanus*², sind. Die Mehrzahl von ihnen zeigt dagegen einen — allerdings sehr schwachen — roten, braunen oder violetten Schimmer. Die Ovarien geschlechtsreifer ♀♀ sind normalerweise sogar immer auffallend violett pigmentiert. Es ist also — streng genommen — nicht richtig, die ssp. *subterraneus* generell als pigmentlos zu bezeichnen, da dieses Prädikat nur auf eine Minderzahl ihrer Individuen zutrifft. Man wird den tatsächlichen Gegebenheiten sicherlich mehr gerecht, wenn man von einer Reduktion des Körperpigments spricht. Trotzdem ist der Pigmentierungsunterschied aller *subterraneus*-Tiere gegenüber den oberirdischen Populationen stets so stark ausgeprägt, daß man niemals in Zweifel sein kann, welcher Form ein bestimmtes Individuum zuzuteilen ist.

Der Gammarus aus dem Ernst-August-Stollen sieht dagegen ganz anders aus. Schon SCHNEIDER sagt, daß diese Tiere „das fast völlige normale dunkle Pigment des gewöhnlichen *Gammarus pulex* aufzuweisen hatten“. Tatsächlich ist an diesen Tieren trotz ihrer unterirdischen Lebensweise nicht die geringste Spur eines Pigmentmangels zu finden. Dennoch ist es aber nicht korrekt, hier von einer normalen Pigmentierung zu sprechen, denn diese Tiere besitzen nicht die bekannte olivgetönte Farbe oberirdischer Populationen, sondern eine intensiv braune bis rotbraune Körperpigmentierung.

SCHNEIDER, dem diese vom Normalen abweichende Pigmentierung der Ernst-August-Population nicht aufgefallen ist, führt die eigenartige Erscheinung, daß bestimmte Höhlenpopulationen ein und derselben Subspecies pigmentlos, andere dagegen intensiv pigmentiert sind, darauf zurück, daß erstere bereits seit mehreren Jahrhunderten unterirdisch leben, letztere dagegen erst seit wenigen Jahrzehnten. So soll der Ernst-August-Stollen — ein unterirdischer Kanal, auf dem ehemals das Erz in Kähnen transportiert wurde — erst relativ spät (etwa in der Mitte des vorigen Jahrhunderts) vom zuvor oberirdisch lebenden Gammarus besiedelt worden sein, und demzufolge konnten sich — nach SCHNEIDER — die „Umwandlungsprinzipien“ erst innerhalb eines relativ kurzen Zeitabschnittes geltend machen, wodurch diese Tiere erst am Anfang einer kontinuierlichen Umwandlung in eine pigmentlose Höhlenform stehen. Demgegenüber soll die Besiedlung der anderen Stollen durch die heute pigmentlosen Formen mit der Anlage der ersten Strecken im 16. und 17. Jahrhundert nahezu zusammenfallen, wodurch den Tieren eine hinreichend lange Zeit für eine vollkommene Pigmentrückbildung

¹ Gemeint ist hiermit offenbar *Niphargus puteanus* (Koch).

² Pigment in Spuren enthält allerdings auch *Niphargus*.

zur Verfügung stand. Über die eigentlichen Ursachen dieser Pigmentverminderung sagt SCHNEIDER recht wenig, läßt jedoch keinen Zweifel darüber, daß diese nur in der absoluten Dunkelheit im Höhlenbiotop zu suchen sind. — Wie jedoch aus den folgenden Untersuchungen hervorgeht, sind diese Ansichten heute nicht mehr haltbar.

D. Die Beeinflußbarkeit der Pigmentbildung unter Laboratoriumsbedingungen

Die Pigmentbildung der Flohkrebse aus den oberirdischen Populationen bleibt unter den normalen Zuchtbedingungen im Laboratorium im allgemeinen gegenüber denen im natürlichen Biotop unverändert. Zwar kommt es gelegentlich zu einer Aufhellung der Körperfarbe, aber diese ist zumeist unbedeutend und wird im allgemeinen nur bei kranken Tieren beobachtet.

Auch die Tiere aus dem Ernst-August-Stollen verhalten sich genau so. Sie behalten ihre intensiv braune bis rotbraune Pigmentierung im Laboratorium bei.

Ganz anders verhalten sich nun die Krebse aus der 11. und 13. Sohle. Deren anfangs gerade noch wahrnehmbarer blasser Farbschimmer intensiviert sich von Tag zu Tag und nach etwa 3—4 Wochen kann dann das von DE LATTIN beschriebene Phänomen des Auftretens abnormer Körperfarben beobachtet werden. Dabei lassen sich mehrere eindeutig definierte Farbtypen unterscheiden. Der erste, relativ häufig vertretene Typ, zeigt die normale Körperfarbe, wie sie bei oberirdisch lebenden Tieren vorkommt. Daneben sind braune, rotbraune und fuchsrote Tiere, die offensichtlich einem einzigen Typ angehören, recht häufig. Diese können nicht oder nur in seltenen Fällen von denen aus dem Ernst-August-Stollen unterschieden werden. Oft, besonders häufig aber bei alten Tieren, geht der braune Farbton in ein Violett über. Ein dritter Typ ist durch eine ziegelrote Farbe gekennzeichnet. Er kann stets ohne Schwierigkeiten von der braunen Form unterschieden werden und geht nicht etwa kontinuierlich in diese über.

Nach den Angaben von DE LATTIN hätte noch ein kleiner Teil der im unterirdischen Biotop gefangenen Flohkrebse pigmentlos bleiben sollen. Dies schien auch zunächst eintreffen, da in der ersten Zeit im Laboratorium tatsächlich einige Tiere mehr oder weniger pigmentlos blieben. Später bildeten aber auch diese Individuen etwas mehr Pigment aus, wenn auch mit etwa zwei Monaten Verspätung und in ganz geringer Intensität. Diese Tiere blieben dann auch weiterhin völlig transparent, so daß sie nur bei Betrachtung auf weißem Untergrund den genannten Farbtypen zugeteilt werden konnten. Die Nachkommen solcher Tiere starben meistens schon als Embryonen oder doch als Brutsackjunge ab und wurden dann aus dem Marsupium ausgeworfen. Die wenigen Jungtiere, die gelegentlich doch noch schlüpfen konnten, blieben dann meist pigmentlos oder doch wenigstens bleich und nahmen kaum an Größe zu. Sie wurden im allgemeinen nicht älter als drei Monate; nur einzelne Geschwistertiere aus solchen Zuchten färbten sich nach anfänglicher Pigmentarmut und gehemmtem Wachstum normal aus und erreichten dann bei normaler Körpergröße noch die Geschlechtsreife.

Fragt man nun nach den Ursachen, die bei *Gammarus pulex* die Pigmentbildung beeinflussen, so wird man zunächst — wie schon SCHNEIDER — dem Lichtfaktor eine ausschlaggebende Bedeutung beizumessen geneigt sein, zumal wir von anderen pigmentlosen Troglobionten — z. B. dem Grottenolm — wissen, daß diese bei Belichtung Pigment auszubilden vermögen, während umgekehrt nur zufällig in Höhlen gelangte Troglaxene — wie etwa *Squalius cephalus* — innerhalb kurzer Zeit ihr Pigment verlieren (KOSWIG 1937). Es wurden deshalb viele hundert normale oberirdische und außerdem unterirdische Flohkrebse, die

bereits Pigment ausgebildet hatten, mehrere Generationen hindurch unter Lichtabschluß gezüchtet. Entgegen den Erwartungen wurden jedoch keine merkbaren Veränderungen der Körperpigmentierung beobachtet, so daß der Versuch nach einer Dauer von fast 3 Jahren abgebrochen wurde¹. Aus diesem Dunkelzuchtexperiment geht also eindeutig hervor, daß dem Licht keine wesentliche Bedeutung für die Pigmentbildung beim *Gammarus* zukommt. Demgegenüber zeigten dann weitere Versuche, daß die Pigmentbildung weitgehend von der Nahrung abhängig ist, die den Tieren geboten wird. Es wurde nämlich beobachtet, daß die Intensität der Körperfarbe je nach dem Gehalt der Nahrung an verwertbaren Carotinoiden sehr großen Schwankungen unterworfen ist. So kann z. B. durch einseitige Fütterung mit Möhren die Farbtintensität außerordentlich gesteigert werden, ohne daß allerdings dadurch die Farbqualität, die in den verschiedenen Farbtypen der ssp. *subterraneus* besonders deutlich zum Ausdruck kommt, irgendwie verändert würde. Auf der anderen Seite führt eine Fütterung mit carotinoidarmer Nahrung zu einem allmählichen Ausblassen der Körperfarbe. Bei Berücksichtigung dieser Tatsache erhebt sich sogar die Frage, ob das Licht überhaupt einen Einfluß auf die Färbung der Tiere hat. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß der ausgesprochene Pigmentmangel der Mehrzahl der Höhlenpopulationen von *Gammarus* vielmehr ausschließlich auf die Armut an carotinoidhaltiger Nahrung im Höhlenbiotop zurückzuführen ist. Unter diesem Aspekt verlieren auch die intensiv pigmentierten Höhlenkrebse der Population des Ernst-August-Stollens ihre Sonderstellung; ihre laufende Nahrungszufuhr ist nämlich oberirdischer Herkunft und dürfte deshalb mehr oder weniger carotinoidreich sein. Den Krebsen der anderen unterirdischen Populationen stehen dagegen lediglich verfaulte Holzreste, Papierreste, Tuchreste u. dgl. zur Verfügung, also eine Nahrung, die fast carotinoidfrei sein dürfte.

Mit diesen mehr allgemeinen Erörterungen über die Pigmentbildung bei *Gammarus pulex* ist nun noch nichts über das Auftreten der verschiedenen Farbtypen in den Höhlenpopulationen ausgesagt. Da jedoch jedes einzelne Individuum ohne nennenswerte Schwierigkeiten entweder dem olivgetönten, dem braunen oder dem roten Typ zugeordnet werden konnte, mußte — wie dies DE LATTIN bereits 1939 zum Ausdruck brachte — damit gerechnet werden, daß diese Farbklassen genetisch bedingt sind.

E. Genetische Untersuchungen

Als Ausgangsmaterial für die genetische Analyse konnten wildfarbene, braune und rote Inzuchtstämme hergestellt werden. Allerdings erwies es sich für die Zucht als außerordentlich erschwerend, daß die wildfarbenen Stämme vorwiegend weibliche, die braunen und roten dagegen vorwiegend oder oft sogar ausschließlich männliche Nachkommen hervorbrachten. Für ein planmäßiges Arbeiten mußten deshalb immer wieder die männchenreichen roten und braunen mit den weibchenreichen wildfarbenen Stämmen gekreuzt und mit Hilfe einer Rückkreuzung erneut reinerbige Farbstämme hergestellt werden. Die Kreuzungskombinationen, die im folgenden genauer beschrieben werden, haben dann als Endresultat erbracht, daß die drei Farbtypen durch eine autosomale multiple Allelenreihe (*r*-Serie) bedingt sind.

¹ Über die Veränderungen am Augenpigment vgl. A. ANDERS, Diss., Mainz (1956).

Kreuzungsergebnisse: wildfarbig \times rot und reziprok ($r^+r^+ \times rr$).

Die F_1 dieser Kreuzung (Tabelle 1) besitzt die normale olivgetönte Pigmentierung ($n = 282$), und die F_2 spaltet in einem 3:1-Verhältnis (362 wildfarbig : 128 rot). Die Merkmale werden also monohybrid vererbt, wobei wildfarbig über rot dominiert. Allerdings ist diese Dominanz nicht in allen Fällen vollständig. So

Tabelle 1. Wildfarbig \times rot ($r^+r^+ \times rr$)

	Anzahl der Zuchten	Anzahl der Indi- viduen	gefunden		erwartet		m \pm
			wild- farben	rot	wild- farben	rot	
F_1	12	282	282	—	282	—	—
F_2	19	490	362	128	367,5	122,5	9,6
F_2R	14	448	448	—	448	—	—
F_2R	34	1080	540	540	540	540	—

mit einer noch zarten Cuticula ist dies sogar häufiger der Fall. Immerhin ist dies Verhalten eine Ausnahme und im ganzen hat die Dominanz wildfarbig $>$ rot generelle Gültigkeit. Rückkreuzungen von r^+r^- mit r^+r^+ -Tieren brachten wieder

Tabelle 2. Wildfarbig \times braun ($r^+r^+ \times R^2R^2$)

	Anzahl der Zuchten	Anzahl der Indi- viduen	gefunden		erwartet		m \pm
			wild- farben	braun	wild- farben	braun	
F_1	5	141	—	141	—	141	—
F_2	13	344	77	267	86	258	8,0
F_2R	15	387	187	200	193,5	193,5	9,8
F_2R	Massen- zuchten	Massen- zuchten	—	+	—	+	—

Im Gegensatz zur vorhergehenden Kombination verhält sich hier die Wildfarbigkeit rezessiv. Die F_1 -Bastarde besitzen ausnahmslos eine braune Körperfarbe. In der F_2 wurde eine ausreichend gesicherte 1:3-Aufspaltung erzielt. Dem-

Tabelle 3. Braun \times rot ($R^2R^2 \times rr$)

	Anzahl der Zuchten	Anzahl der Indi- viduen	gefunden		erwartet		m \pm
			braun	rot	braun	rot	
F_1	10	351	351	—	351	—	—
F_2	26	573	433	140	429,75	143,25	10,4
F_2R	13	366	194	172	183	183	9,6
F_2R	Massen- zuchten	Massen- zuchten	+	—	+	—	—

Rückkreuzung der braunen Bastarde mit reingezüchteten braunen R^2R^2 -Individuen ausnahmslos wieder braune Nachkommen hervorbrachten (Massenzuchten).

Braun \times rot und reziprok ($R^2R^2 \times rr$, Tabelle 3).

Auch in dieser Kombination erwies sich die braune Körperfarbe als dominant: die F_1 war ausnahmslos braun pigmentiert. In der F_2 wurde dann erwartungsgemäß wieder eine 1:3-Aufspaltung erhalten. Rückkreuzungen mit der rezessiven

lassen sich ganz normal olivgetönte r^+r^- -Bastarde gelegentlich nach Häutungen an einer mehr oder weniger auffallenden Aufhellung der Pigmentierung von r^+r^+ -Tieren unterscheiden. Bei jüngeren Individuen eine einheitlich olivgetönte Nachkommenschaft, während die Paarungen $r^+r \times rr$ eine genaue 1:1-Aufspaltung zeigten.

Wildfarbig \times braun und reziprok ($r^+r^+ \times R^2R^2$, Tabelle 2).

entsprechend zeigten auch die Rückkreuzungen die gewohnten Verhältnisse. Rückkreuzungen der R^2r^+ -Bastarde mit wildfarbenen r^+r^+ -Krebsen ergaben 187 wildfarbige und 200 braune Nachkommen — während die

Ausgangsform brachten das zu erwartende 1:1-Verhältnis. In entgegengesetzter Richtung durchgeführte Rückkreuzungen zeigten wieder eine einheitlich braun pigmentierte F_2R (Massenzuchten).

Die polyallele Bedingtheit der Farbtypen

Nach den bisher mitgeteilten Kreuzungsergebnissen mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die Erbfaktoren r^+ , R^2 und r Glieder einer polyallelen Reihe sind. Es wurden deshalb systematisch alle weiteren möglichen, die Faktoren r^+ , R^2 und r gleichzeitig enthaltenden Kreuzungskombinationen durchgeführt, weil gerade diese für den Nachweis einer Polyallelie entscheidend sind (Tabelle 4). In der Kombination $r^+r \times R^2R^2$ ist die Nachkommenschaft entsprechend dem in einem Elterntier in homozygotem Zustand vorhandenen R^2 -Faktor einheitlich braun pigmentiert. Die beiden Kreuzungen $r^+r \times R^2r^+$ und $rr \times R^2r^+$ ergaben übereinstimmend eine Nachkommenschaft von 50% wildfarbig:50% braunen Jungtieren. Rotgefärbte Individuen, deren regelmäßiges Vorkommen in diesen Kreuzungskombinationen gegen die polyallele Bedingtheit der Farbtypen sprechen würden, treten hier nicht auf. Schließlich zeigt die Kreuzung wildfarbener r^+r - mit braunen R^2r -Tieren eindeutig, daß die Faktoren r^+ , R^2 und r tatsächlich einer Allelenserie angehören, denn hier treten neben den wildfarbenen (96) und braunen (163) außerdem noch rote Nachkommen (81) auf, die insgesamt einem recht guten 1:2:1-Verhältnis entsprechen.

Tabelle 4. Nachweis der r -Serie

Kombination wildfarben (rot) \times braun	Anzahl der Zuchten	Anzahl der Individuen	gefunden			erwartet			m \pm
			wild- farben	braun	rot	wild- farben	braun	rot	
$r^+r \times R^2R^2$	3	146	—	146	—	—	146	—	—
$r^+r^+ \times R^2r$	3	46	25	21	—	23	23	—	3,4
$r^+r \times R^2r^+$	9	216	100	116	—	108	108	—	7,3
$rr \times R^2r^+$	7	152	73	79	—	76	76	—	6,2
$r^+r \times R^2r$	10	340	96	163	81	85	170	85	8,0; 9,2

Prädetermination der Körperpigmentierung

Der Erbgang der drei Farballele weist nun noch Besonderheiten auf. Versucht man nämlich die Auszählung der Farbklassen schon bei den frischgeschlüpften Jungtieren vorzunehmen und nicht erst — wie es sich für die Analyse der Farballele als notwendig erwies — bei solchen in adultem Zustand, dann zeigt sich, daß die gesamte Nachkommenschaft eines Elternpaares unabhängig von der eigenen genetischen Konstitution stets einheitlich pigmentiert ist und daß sie stets dem Farbtyp des Muttertieres angehört. Die eigene genetische Natur der Jungtiere setzt sich — wenn sie von derjenigen des Muttertieres abweicht — erst später im Phänotypus durch. Wir haben es also hier mit einem charakteristischen Beispiel einer Prädetermination zu tun, das schon allein wegen der gen-physiologischen Möglichkeiten, die es bietet, besonderes Interesse beansprucht. Es wurden deshalb noch weitere biologische Beobachtungen und Versuche über die Prädetermination der Körperfarbe angestellt.

Während die Färbung männlicher Flohkrebse unter konstanten Umweltbedingungen weitgehend stabil ist, unterliegt sie bei weiblichen Tieren deutlichen Schwankungen, die von Vorgängen verursacht werden, die mit der Eireifung einhergehen: Die 6—18 Eizellen in den Ovarien reichern nämlich im Verlaufe ihres Heranwachsens allmählich Pigment an und nehmen schließlich eine intensiv schwarzblaue Färbung an, die ihr Maximum kurz vor der Oviposition erreicht. Mit der zunehmenden Pigmentanreicherung in den Eizellen schwindet nun aber gleichzeitig das Körperpigment der Muttertiere. Die Färbungsintensität von Körpergewebe und Eizellen verhält sich also umgekehrt proportional. Im Extremfall können solche ♀ sogar vorübergehend ganz transparent werden, so daß man die in den Ovarien liegenden schwarzblauen Eizellen einzeln auszählen kann. Die Annahme, daß das Muttertier einen sehr großen Teil seines Körperpigments direkt in die heranwachsenden Eier überführt, liegt also nahe.

Diese Annahme findet durch den Vergleich der Papierchromatogramme (Petroläther als Solvens: Alkohol, Aceton) von ganzen Tieren und einer größeren Anzahl Eier eine weitere Stütze. Soweit man dies solchen Chromatogrammen ansehen kann, sind die Pigmente des Gesamttieres und der Eier vermutlich identisch; zumindest zeigen sie chromatographisch genau das gleiche Verhalten¹.

Carotinoidübertragung vom Muttertier auf die Eier ist schon bei vielen anderen Tiergruppen nachgewiesen worden. Sehr eingehend wurden diesbezüglich die Forelle durch STEVEN (1949, 1951) und der Hummer durch GOODWIN (letzte Zusammenfassung 1952) untersucht. — Besonders eindrucksvoll ist nach eigenen Beobachtungen auch der Carotinoidtransport bei *Niphargus puteanus*. Diese Tiere besitzen carotinoides Körperpigment nur in Spuren (BEATTY 1949), so daß sie schlechthin als pigmentlos gelten. Zur Zeit des Heranwachsens der Eizellen werden — besonders in der letzten Wachstumsphase, in der die Eizellen sehr schnell an Größe zunehmen — diese Spuren von Pigment aus dem Körper abgezogen und in der Nähe der Ovarien konzentriert, bis sie schließlich ganz in die Eizellen übergehen. In extremen Fällen sind dann die Eier dieses sonst farblosen Höhlenbewohners auffallend dunkelblau gefärbt.

Die früheste Embryonalentwicklung der Jungtiere entzieht sich in Anbetracht der störenden schwarzblauen Pigmentierung der Eier einer genauen Beobachtung. Später hellen sich dann die Eier auf, während gleichzeitig das carotinoide Pigment in den umfangreichen Dottervorräten der embryonalen Leberschläuche konzentriert wird. Die Embryonen selbst erscheinen in diesem Zustand pigmentlos, und nur deren Leberschläuche besitzen eine mehr oder weniger einheitlich gelbe bis rote Farbe, die aber keine Beziehung zu den Farbklassen der adulten Tiere erkennen läßt.

Nachdem die Jungtiere aus den Eiern geschlüpft sind, nähren sie sich während ihres vier- bis sechstägigen Aufenthaltes im mütterlichen Marsupium von ihren Dottervorräten in den Leberschläuchen. Bei Jungtieren, die eben den Brutsack verlassen haben und die mit der Ausfärbung begonnen haben, kann dann das eingangs beschriebene Prädeterminationsphänomen beobachtet werden. Da die frisch geschlüpften Jungtiere wohl nicht in der Lage sind, von sich aus Carotinoide aufzubauen, sie aber andererseits noch gar keine Nahrung aufgenommen haben, aus der sie solche hätten entnehmen können, darf wohl mit Sicherheit angenommen werden, daß das Pigment der schlüpfenden Jungtiere auf das vom

¹ BEATTY (1948), der die carotinoiden Körperpigmente von *Gammarus pulex* chemisch untersucht hat, findet hierin ein Carotin, vier Xanthophylle und einen weiteren Farbstoff, den er mit „Carotinoid acid“ bezeichnet.

Muttertier gelieferte Eipigment zurückgeht. Es ist also nur zu verständlich, daß dieses Pigment zunächst dem Farbtyp des Muttertieres entspricht. — Falls dann Muttertier und Jungtiere auf Grund verschiedener genetischer Konstitutionen verschiedenen Farbklassen angehören, findet späterhin eine Umfärbung der Jungtiere statt.

Man sollte nun erwarten, daß solche Jungtiere die ihrem jeweiligen Genotyp entsprechende Pigmentierung in dem Augenblick anlegen, wenn sie mit der Nahrungsaufnahme beginnen. Tatsächlich erfolgt aber die Umfärbung in den verschiedensten Lebensaltern, teils schon bei wenige Tage alten Tieren, teils erst bei solchen, die bereits geschlechtsreif geworden sind. Irgendeine Gesetzmäßigkeit für den Zeitpunkt der Umfärbung läßt sich daher nicht angeben. Trotzdem kann festgestellt werden, daß die Umfärbung bei Nachkommen fuchsröter R^2 -Muttertiere offenbar häufiger als sonst zu einem sehr späten Termin stattfindet. Nach einem kurzen Zwischenstadium erscheint dann die definitive, dem Jungtier erbgemäße Pigmentierung.

F. Diskussion

Das vorliegende Tatsachenmaterial zeigt eindeutig, daß die cavernicole Form des gemeinen Bachflohkrebses, die im Höhlenbiotop so gut wie pigmentlos ist, im Laboratorium in einer braunen, einer olivgetönten und einer roten Farbkategorie auftritt und daß diese drei Farbkategorien durch die autosomale Allelenreihe R^2 , r^+ und r (r -Serie) bedingt sind. Im allgemeinen ist die Dominanz dieser Allele in der angegebenen Reihenfolge jeweils vollkommen; das Standardallel steht hierbei in der Mitte.

Angesichts dieser Dominanzverhältnisse tauchten zunächst Zweifel auf, ob das Allel für die olivgetönte Farbkategorie tatsächlich als „Standardallel“ der r -Serie aufgefaßt werden könne, denn es ist nämlich nicht sehr geläufig, daß ein Gen sowohl zu einem rezessiven als auch zu einem dominanten Allel mit etwa gleichartigem phänotypischen Effekt mutiert. Ein solches Verhalten spricht aber — trotz seiner offenkundigen Seltenheit — nicht gegen diese Auffassung. Ein ähnlicher Fall ist z. B. schon durch Untersuchungen von HOWARD (1953) an *Armadillidium vulgare* bekannt geworden. Auch bei diesen Tieren steht bei einer multiplen Reihe von drei Farballelen das Standardallel bezüglich der Dominanz in der Mitte, während das dominante und das rezessive Allel jeweils eine abnorme rufinistische Körperfarbe bedingen. Weitere derartige Fälle führt HOWARD aus dem Pflanzenreich an. — Schließlich verliert dieses Phänomen bei *Gammarus pulex* seine Sonderstellung noch aus anderen Gründen. Prüft man nämlich die Intensität der Farben, dann zeigt sich, daß dem Pigment der R^2 -Tiere eine sehr viel größere Deckkraft zukommt als dem der beiden anderen. Besonders deutlich wird dies, wenn man die normalerweise aus dem Körperinnern durchscheinenden, durch Carotinoide rot gefärbten Fetttropfen als Gradmesser für die Deckkraft der durch die Allelenreihe bedingten Körperpigmentierung verwendet. Dann zeigt sich, daß die Fetttropfen — obwohl vorhanden — in R^2 -Individuen nicht oder kaum sichtbar sind, während man sie in r^+ - und r -Tieren weit besser erkennt. Der Dominanzeffekt des R^2 -Allels könnte also recht gut nur durch die große Deckkraft der rotbraunen Pigmentierung zustande kommen. Es erscheint also trotz der anfänglichen Zweifel vollauf gerechtfertigt, die Bezeichnung „Standard-

allel“ und damit nomenklatorisch das Zeichen „+“ für die olivgetönte Farbkategorie zu reservieren, weil sie in oberirdisch lebenden Populationen die weitaus vorherrschende ist und daher deren Gesamtbild bestimmt.

Im folgenden sei nun etwas näher auf den prädeteterminativen Erbgang dieser *r*-Serie eingegangen, zumal prädeteterminierte Vererbung der Körperfarbe bei Amphipoden nicht neu ist, sondern schon von SEXTON und PANTIN (1927) bei gewissen Farbtypen von *Gammarus chevreuxi* beobachtet wurde. Hier soll nun die Prädetetermination der Körperpigmentierung bei beiden Arten verglichen werden.

Bei *Gammarus chevreuxi* liegen die Dinge insofern ziemlich übersichtlich, als sich hier das Prädeteterminationsgeschehen offenbar nur zwischen einer pigmentlosen („Whites“; rezessiv) und einer aberrant pigmentierten Form (*New Reds*: dominant) abspielt. Dabei sind die F_1 -Jungtiere aus der Kreuzung *White* ♀ × *New Red* ♂ zunächst immer „Whites“ und diejenigen aus der reziproken Kombination *New Red* ♀ × *White* ♂ (auch dann, wenn das ♀ heterozygot für „White“ war) immer „*New Reds*“; sie sind also stets genau so pigmentiert wie das Muttertier. Diejenigen Jungtiere aber, die auf Grund ihrer genetischen Konstitution wie das Vattertier gefärbt sein müßten, nehmen dann erst später die ihnen erbgemäße Pigmentierung an („*Changelings*“). — Auch der Zeitpunkt der Ausfärbung bzw. Entfärbung der prädeteterminierten Jungtiere zeigt bei *Gammarus chevreuxi* übersichtliche Verhältnisse. So finden hier die Entfärbung der für die Pigmentlosigkeit homozygoten Jungtiere eines pigmentierten Muttertieres und die Ausfärbung heterozygoter Jungtiere eines pigmentlosen Muttertieres mit Beginn von Nahrungsaufnahme und Wachstum statt.

Bei *Gammarus pulex* findet nun die Prädetetermination ebenso eindeutig zwischen den drei untersuchten pigmentbildenden Genotypen statt. Die jeweiligen Jungtiere machen dann stets eine Umfärbung durch (etwa von rot nach braun, von braun nach olivgrau oder von olivgrau nach rot usw.). Außerdem läßt aber der Zeitpunkt der Umfärbung keine direkte Beziehung zu Alter, Beginn der Nahrungsaufnahme und Körpergröße der betreffenden Jungtiere erkennen, wie dies bei *Gammarus chevreuxi* offenbar der Fall ist. Es bestehen also bei beiden Arten trotz des weitgehend übereinstimmenden Phänomens einige bemerkenswerte Unterschiede.

Für die Deutung dieses Prädeteterminationsgeschehens gibt es nun mehrere grundsätzliche Möglichkeiten, zwischen denen zur Zeit noch nicht entschieden werden kann. Mit Sicherheit muß aber vorausgesetzt werden, daß vom Muttertier ein stofflicher Einfluß auf das Ei ausgeübt wird, der sich anfänglich auch gegen den Genotyp des sich entwickelnden Jungtieres durchsetzt.

Die bestehenden Möglichkeiten sind folgende:

1. Die Übertragung eines Wirkstoffes, der schon im Muttertier für die Ausbildung einer bestimmten Pigmentierung erforderlich ist und nun im Jungtier dieselbe Wirkung entfaltet; 2. einer spezifischen Vorstufe, die im Jungtier notwendigerweise zu einem ganz bestimmten Pigment führt, das auch das mütterliche ist; 3. des Pigmentes des Muttertieres selbst. Diese drei Möglichkeiten könnten sowohl getrennt wie auch in Kombination verwirklicht sein.

Für *Gammarus chevreuxi* stößt die Deutung des Prädeteterminationsvorganges auf keine sehr großen Schwierigkeiten. Bei dieser Art wird in dem einen Falle

das mütterliche Eipigment offenbar mit zunehmender Körpergröße der jungen Krebse verdünnt, bis diese pigmentlos sind, während in dem anderen Falle offenbar so gut wie gar kein Pigment auf die Eier übertragen wird, sondern dieses erst vom Jungtier selbst nach Beginn der Nahrungsaufnahme gebildet wird. Allerdings denken SEXTON und PANTIN in Anbetracht der vom Körperpigment abweichenden Eifarbe nicht an die Übertragung des definitiven Körperpigmentes (Punkt 3), sondern seiner Vorstufen (Möglichkeit 2). Die biologischen Beobachtungen und die papierchromatographischen Untersuchungen an *Gammarus pulex* sprechen allerdings mehr für die Übertragung des aus mehreren Carotinoiden bestehenden Pigments selbst, obwohl auch hier die schwarzblaue Eifarbe zunächst etwas anderes vermuten ließe; diese dürfte möglicherweise nur sekundärer Natur sein (etwa größere Konzentration der Carotinoide, Bindung als Lipochrom oder Chromoprotein). Die Annahme einer Wirkstoffübertragung würde sich in diesem Falle erübrigen.

Bei *Gammarus pulex* lassen sich die meisten Beobachtungen an der prädeterminativ bedingten Körperfarbe und der später erfolgenden Umfärbung zum erbgemäßen Phänotyp ebenfalls ohne Schwierigkeiten durch eine Übertragung des mütterlichen Eipigments, das dann im Verlaufe der postembryonalen Größenzunahme verdünnt und schließlich durch das vom Jungtier selbst gebildete Pigment abgelöst wird, deuten. Indessen kann aber oft — vor allem in bestimmten Fällen fuchsroter R^2 -Tiere, die hier besonders als Beispiel herangezogen seien — die von der Mutter stammende und durch das Ei übertragene Pigmentmenge mit Sicherheit niemals ausreichen, um ein etwa fast adultes Tier intensiv R^2 -gemäß auszufärben. Man wird also hier außerdem noch mit anderen Mechanismen für die Manifestation der prädeterminierten Körperfarbe, die vielleicht an die Anwesenheit eines Wirkstoffes geknüpft sind, rechnen müssen (Möglichkeit 1).

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die erbliche Bedingtheit der variablen Körperpigmentierung von *Gammarus pulex* ssp. *subterraneus* zu untersuchen. Darüber hinaus bleiben noch zwei andere Fragenkomplexe, die hiermit eng verknüpft sind, weiteren speziellen Untersuchungen vorbehalten. Diese befassen sich einmal damit, daß die drei Glieder der r -Serie nicht nur die Körperfarbe von *Gammarus pulex* ssp. *subterraneus* bedingen, sondern außerdem als relative Geschlechtsrealisatoren an der Bestimmung und Vererbung des Geschlechts maßgeblich und oft sogar entscheidend beteiligt sind, zum anderen aber mit der evolutionistisch interessanten Frage, daß diese Farbvariabilität an einem Organismus auftritt, der in seinem natürlichen Höhlenbiotop gar kein oder doch so gut wie gar kein Pigment besitzt (vgl. die Diskussion über das Höhlentierproblem bei KOSSWIG 1937 und DE LATTIN 1939).

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. DE LATTIN möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für seine stete Anteilnahme am Fortschreiten der Untersuchungen danken.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. W. v. BUDDENBROCK für die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie vor allem für seine stete großzügige Unterstützung und Fürsorge.

Auch den Herren der Bergwerksleitung von Bad Grund, insbesondere Herrn Direktor Dr. SALAU, habe ich für lebenswürdige Unterstützung beim Sammeln der Tiere zu danken.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Höhlenform des gemeinen Bachflohkrebses, *Gammarus pulex* ssp. *subterraneus* (SCHNEIDER), die in ihrem natürlichen Habitat (Bergwerkstollen bei Bad Grund im Harz) so gut wie pigmentlos ist, bildet unter normalen Laboratoriumsbedingungen Pigment aus. Dabei nimmt nur ein Teil der Tiere die vom oberirdisch lebenden Flohkrebs her bekannte olivgetönte Wildfarbe an, während die anderen in einem braunen und einem ziegelroten Farbtyp auftreten.

2. Diese drei Farbtypen werden durch die autosomale Allelenreihe (*r*-Serie) R^2 (braun), r^1 (olivgrau) und r (rot) bedingt. Die Dominanz ist in der angegebenen Reihenfolge im allgemeinen jeweils vollkommen.

3. Die durch die *r*-Serie kontrollierten Merkmale werden vom Muttertier prädeterminativ auf die Nachkommen vererbt; diese färben sich dann erst später — falls Muttertier und Jungtiere verschiedenen Genotypen angehören — ihrer eigenen genetischen Konstitution entsprechend um.

Literatur

- ANDERS, A.: Untersuchungen über die Pigmente einiger Augenfarbmutanten von *Gammarus pulex* L. Verh. Dtsch. Zool. Ges. in Erlangen, 1955. — ANDERS, F.: Über die carotinoiden Körperpigmente und die Geschlechtsbestimmung von *Gammarus pulex* L. Naturwiss. **40**, 27 (1953). — ANDERS, F., u. A. MICHEL: Über die Pigmente im Auge von *Gammarus pulex* L. (Crust. Amphipoda). Naturwiss. **41**, 72 (1954). — BAUER, L.: Trennung der Karotinoide und Chlorophylle mit Hilfe der Papierchromatographie. Naturwiss. **39**, 88 (1952). — BEATTY, R. A.: The pigmentation of cavernicolous animals II. Carotinoid pigments in the cave environment. J. of Exper. Biol. **18**, 144—152 (1941). — The pigmentation of cavernicolous animals III. The carotinoid pigments of some amphipod crustacea. J. of Exper. Biol. **26**, 125—130 (1949). — CHAPPUIS, P. A.: Aus THIENEMANN, Die Binnengewässer. „Die Tierwelt der unterirdischen Gewässer.“ 1927. — GLOVER, M., R. A. MORTON and G. D. ROSEN: Astaxanthin, cholesterol and lipins in developing salmon eggs. Biochemic. J. **50**, 425—429 (1952). — GOODWIN, T. W.: Carotinoid distribution in the gonads of the limpets *Patella vulgata* and *P. depressa*. Biochemic. J. **47**, 249—251 (1950). — Carotinoids in fish. Biochemic. J. **47** (1950). — The biochemistry of fish. Biochem. Soc. Symposia **1951**, No 6, 1—105. — Carotinoid metabolism during development of lobster eggs. Nature (Lond.) **167**, 559 (1951). — Carotinoids and reproduction. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **25**, 391 (1952). — GOODWIN, T. W., and M. M. TAHA: The carotinoids of the gonads of the limpets *Patella vulgata* and *Patella depressa*. Biochemic. J. **47**, 244—249 (1950). — GRANGAUD, R., et I. GARCIA: Chromatographie de partage des caroténoides. I. Séparation de l'astaxanthine. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **34**, 754—760 (1952). — HAEMPEL, O.: Über die Fortpflanzung und künstliche Zucht des gemeinen Flohkrebsses. *Gammarus pulex* und *fluviatilis*. Allg. Fisch.-Ztg. **1908**, 33. — HEINZE, K.: Fortpflanzung und Brutpflege bei *Gammarus pulex* L. und *Carinogammarus roeseli* Gerv. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **51**, 397—440 (1932). — HOWARD, H. W.: The genetics of *Armadillidium vulgare* Latr. III. Dominant and recessive genes for red body colour. J. Genet. **51**, 259—269 (1953). — KARRER, P., u. E. JUCKER: Carotinoide. Basel: Birkhäuser 1948. — KOSSWIG, C.: Über Pigmentverlust während des Höhlenlebens. Zool. Anz. **1937**, 117. — Über die Variabilität bei Höhlentieren. Mitt. Höhlen-Karstforsch. **1937**. — Betrachtungen und Experimente über die Entstehung von Höhlentiermerkmalen. Züchter **9**, 91—101 (1937). — KUHN, R., J. STENE u. N. A. SÖRENSEN: Über die Verbreitung des Astaxanthins im Tier- und Pflanzenreich. Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 1688 (1939). — LATTIN, G. DE: Über die Evolution der Höhlentiercharaktere. Sitzgsber. Ges. naturforsch. Freunde Berl. **1939**, 32. — LEDERER, E.: Les caroténoides des animaux. Acta sci. et industr. **1935**, 238. — LÖNNBERG, E.: Zur Kenntnis der Carotinoide bei marinen Evertebraten. I. Ark. Zool. (Stockh.) **23**, 15 (1932). — Zur Kenntnis der Carotinoide bei marinen Evertebraten. Ark. Zool. (Stockh.) **35**, 1 (1934). — MÜHLMANN, H.: Variationsstatistische Untersuchungen und Beobachtungen an unter- und oberirdischen Populationen von *Gammarus pulex* L.

Zool. Anz. **122**, 71—87 (1938). — Die rezente Metazoenfauna der Harzer Höhlen und Bergwerke. Zoogeographica **4**, 187—252 (1942). — Verzeichnis sämtlicher bisher in Harzer Höhlen und Bergwerken gefundener Metazoen. Z. Karst- u. Höhlenkde. **1942/43**, 184—216. — SCHELLENBERG, A.: Der *Gammarus* des deutschen Süßwassers. Zool. Anz. **108**, 209—217 (1934). — Amphipoda. Aus DAHL, Die Tierwelt Deutschlands, **40**, 1942. — SCHNEIDER, R.: Der unterirdische *Gammarus* von Clausthal. Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss. Berlin, Physik.-math. Kl. **49**, 1087 (1885). — Über subterrane Organismen. Abh. Progr. Real-Gymnasium Berlin **1885**, 1—32. — SEXTON, E. W., and A. R. CLARK: Heterozygotes in a wild population of *Gammarus chevreuxi* Sexton. J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd. **21**, 319—355 (1936). — A summary of the work on the Amphipod *Gammarus chevreuxi* Sexton carried out at the Plymouth Laboratory 1912—1936. J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd. **21**, 357—414 (1936). — SEXTON, E. W., and C. F. A. PANTIN: Inheritance in *Gammarus chevreuxi* Sexton. Nature (Lond.) **1927**. — STEVEN, D. M.: Study on animal carotinoids. I. Carotinoids of the brown trout *Salmo trutta* Linn. J. of Exper. Biol. **25**, 369 (1948). — Study on animal carotinoids. II. Carotinoids in the reproductive cycle of the brown trout. J. of Exper. Biol. **26**, 295 (1949). — VALKANOW, A.: Einige Worte über die rote Färbung der Tiere der Hochgebirgsseen. Zool. Anz. **95**, 327 (1931). — WAGLER, E.: Zucht von Krebsen und Würmern. Aus ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethode, Abt. IX, Teil 2. 1937. — WESENBERG-LUND, C.: Biologie der Süßwassertiere. Wien: Springer 1939. — WILLER, A.: Nahrungsuntersuchungen bei niederen Wassertieren. III. Nahrungsuntersuchungen bei dem Flohkrebs (*Gammarus pulex*). Z. Fischerei **21**, 5 (1922). — WOLF, B., u. W. JUNK: Animalium Cavernarum Catalogus, Bd. 3. 1934. — WUNSCH, H. H.: Beiträge zur Biologie von *Gammarus pulex*. Arch. f. Hydrobiol. **13**, 478—531 (1922). — Methoden der Fischereibiologie. In ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethode, Abt. IX, Teil 2. 1937.

Dr. FRITZ ANDERS, Forschungsinstitut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof/Pfalz

DER FAKTOR *ML* (MUSTERLOS) IN KOMBINATION MIT ANDEREN
MUTIERTEN FAKTOREN VON *EPHESTIA KÜHNIELLA*

Von

ALFRED KÜHN

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. März 1956)

Bei der Mutation *ml* fällt das Zeichnungsmuster auf den Flügeln und auf dem Körper weg (Abb. 1b, 2b). Es wird nur der Farbtypus von Schuppen gebildet, der bei der Wildform die hellen Zeichnungselemente stellt (KÜHN 1941). Die



a



b

Abb. 1a u. b. Flügelhaltung in Ruhe-
lage bei der Wildform (a) und bei der
Mutante *ml* (b) von *Ephestia kühniella*

Wirkung der Mutation ist aber nicht auf dieses Schuppenmerkmal beschränkt. Fast immer fallen die musterlosen Tiere in der Ruhe durch eine abnorme Flügelhaltung auf. Die normalen Falter legen die Flügel dicht an den Körper an, und der eine Vorderflügel überdeckt mit seinem Hinterrand etwas den andern (Abb. 1a). Die Hinterflügel werden normalerweise unter den Vorderflügeln in bestimmten Faltungslinien fächerartig zusammengelegt (KÜHN und HENKE 1929, S. 81, Abb. 32a). Bei sitzenden *ml*-Faltern sind die Flügel meist gespreizt, die Hinterflügel ragen unzusammengelegt über die abwärts gedrehten Vorderflügel vor (Abb. 1b). Oft sind die Vorderflügel zwischen den Adern etwas nach der Unterseite hin gefaltet. Die *ml*-Tiere fliegen etwas ungeschickter als normale.

In der Kreuzung mit dem Wildtypus (Tabelle 1) ist *ml* vollständig rezessiv in dem Schuppenmerkmal und in der Flügelhaltung. Die Entwicklungsgeschwindigkeit ist bei beiden Phänotypen gleich (Abb. 3), und in der Vitalität stehen die Rezessiven nicht hinter dem Wildphänotypus zurück.

Tabelle 1. F_2 aus der Kreuzung
musterlos \times Wildmuster $n = 625$;
 $n_z = 4$; 151,2 Tiere je Zucht

	+	$\frac{ml}{ml}$
Befund . .	445	180
Spaltzahl .	2,85	1,15
mE	0,07	

In Verbindung mit dem aufhellenden Faktor *Hu* (helles Umfeld) macht sich *ml* auch heterozygot geltend: die Tendenz zur Bildung heller Schuppen wird vermehrt. Die Aufhellung reicht bis ins Zentralfeld hinein, und die dieses begrenzende dunkle Binde wird mehr oder weniger ausgelöscht (SEEGER 1955).

In 3 Zuchten (Tabelle 2) enthielten die Wildfarbigen der Kreuzung $ml^+ \times ml$ den Faktor *Sy*, einen Letalfaktor, der sich heterozygot durch ein verschmälertes Symmetriefeld manifestiert (Abb. 2e. KÜHN 1932, KÜHN und HENKE 1936). In F_1 waren erwartungsgemäß alle Tiere wildfarbig und zur Hälfte *Sy*. In der F_2 waren 3 Phänotypen zu erwarten in den Anzahlen 6 $+/-$: $+/Sy$ (wildschuppig mit verschmälertem Symmetriefeld), 3 $+/+$; $+/-$ (Wildform) und 3 ml/ml ; $+/-$.

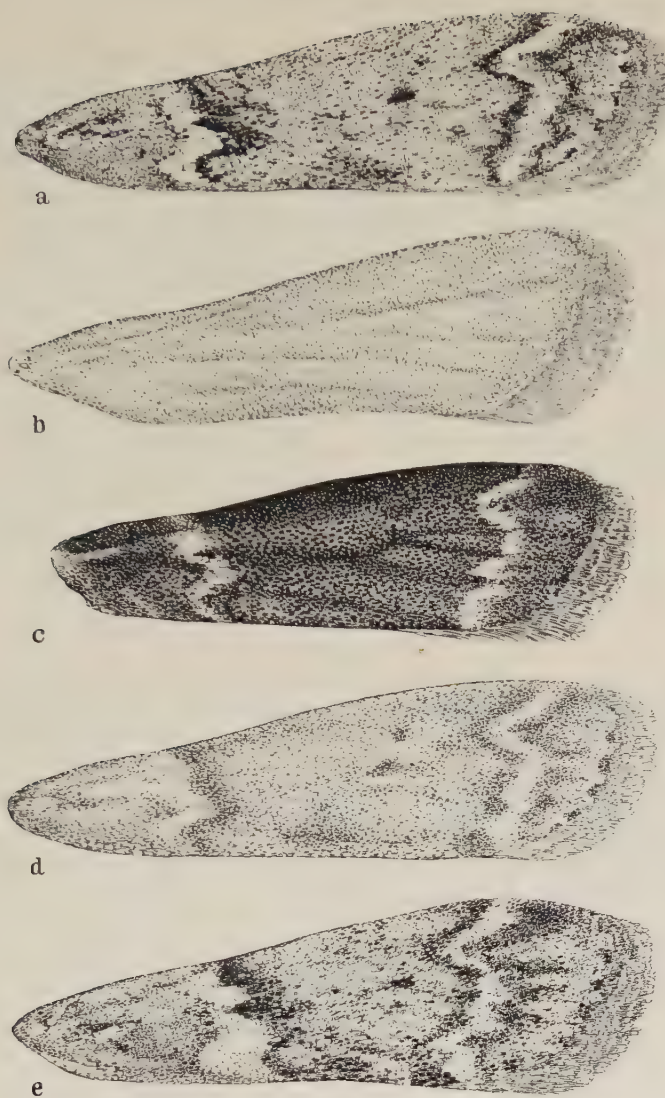


Abb. 2a—e. Rechter Vorderflügel von der Wildform (a) und den Mutanten *ml* (b), *b* (c), gehemmt ausgefärbt (d) und *Sy* (verschmälertes Symmetriefeld)

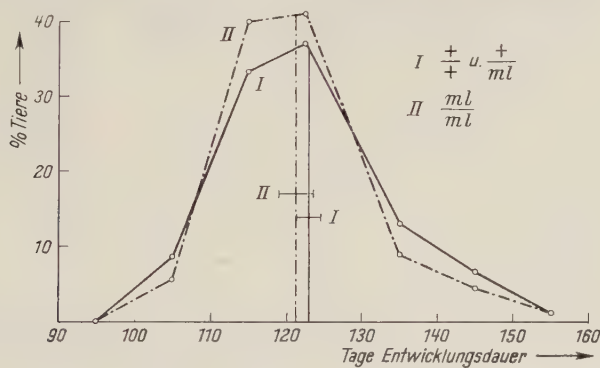


Abb. 3. Entwicklungsdauer der Phänotypen in der $F_2 \left(\frac{+}{ml} \right)^2$. Mittelwerte und Spielräume $\pm 3 m$

(musterlos). Die Wildphänotypen fehlten aber ganz; es traten nur *Sy*- und *ml*-Tiere im Verhältnis von 2:1 auf (Tabelle 2). Das beweist eine vollständige oder hochgradige *Koppelung des ml-Paares mit dem Sy-Paar*. Das bestätigen auch 2 Rückkreuzungen, in denen $\neg/Sy: +/ml$, mit dem *ml*-Stamm zurückgekreuzt wurden. Bei freier Kombination waren die Phänotypen 2 *ml*, 1 *Sy* und 1 wild zu erwarten. Es erschienen aber nur 196 *Sy*- und 215 *ml*-Tiere.

Die *Mutante b* stellt einen extremen Gegensatz zu *ml* dar: Außer in den Bezirken, die den hellen Zeichnungselementen der Wildform entsprechen, tritt nur der dunkelste Schuppenfarbtypus auf, der bei Wildfarbigen die dunklen Zeichnungselemente bildet (Abb. 2c; vgl. KÜHN und HENKE 1929, 1932). Bei der

Tabelle 2. *F*₂ der Kreuzung *ml* × *Sy*.
n = 317; *n*_z = 3; 105,7 Tiere je Zucht

Phäno- typen	<i>ml</i>	<i>Sy</i>
Befund	99	218
Spaltzahl . . .	0,94	2,06
<i>mE</i>	0,08	

Tabelle 3. *F*₂ aus der Kreuzung *musterlos* × *schwarzschuppig*. *n* = 2929; *n*_z = 20;
146,5 Tiere je Zucht

	$\frac{+}{\cdot} \frac{+}{\cdot}$	$\frac{ml}{ml} \frac{+}{\cdot}$ und $\frac{ml}{ml} \frac{b}{b}$	$\frac{+}{\cdot} \frac{b}{\cdot}$
Befund .	1708	699	522
Spaltzahl	9,33	3,82	2,85
<i>E</i> ± <i>mE</i> .	9 ± 0,15	4 ± 0,14	3 ± 0,14

Kombination von *ml* und *b* mußte sich zeigen, wie sich die Tendenz zur Schwarzschuppigkeit und zur Hellschuppigkeit zueinander verhalten. Es ergibt sich (Tabelle 3), daß *ml* *vollkommen epistatisch über b* ist. Die Anzahl der Musterlosen nähert sich 4/16; der *b*-Phänotypus bleibt etwas unter 3/16.

Auch die trihybride Kreuzung des *ml*-Stammes mit einem schwarzschuppig gehemmt ausgefärbten Stamm (*b he*, Tabelle 4) zeigt wieder die Epistase von *ml* über *b* (12/64 Musterlose). Die *Ausfärbungshemmung durch he* betrifft ebenso die Musterlosen wie die Wildfarbigen und Schwarzschuppigen. Bei den Musterlosen ist die dunkle Schuppenbasis der am Endabschnitt weißen Schuppen verblaßt. Die Tiere mit Ausfärbungshemmung bleiben hinter den andern in den Spaltzahlen zurück. Das entspricht früheren Erfahrungen, daß *he* mit vielen Restgenotypen (nicht mit allen, SCHWARTZ 1941) vitalitätssenkend wirkt (KÜHN 1935, 1939).

Tabelle 4. *F*₂ aus Kreuzung: *musterlos* × *schwarzschuppig*, gehemmt ausgefärbt. *n* = 2483;
*n*_z = 19; 137,7 Tiere je Zucht

	Wildtypus	<i>musterlos</i>	<i>schwarz- schuppig</i>	Wildmuster gehemmt ausgefärbt	<i>musterlos</i> gehemmt ausgefärbt	<i>schwarzschup- pig gehemmt</i> ausgefärbt
		$\frac{ml}{ml} \frac{+}{\cdot} \frac{+}{\cdot}$ und $\frac{ml}{ml} \frac{b}{\cdot} \frac{b}{\cdot}$	$\frac{+}{\cdot} \frac{b}{\cdot} \frac{+}{\cdot}$ $\frac{+}{\cdot} \frac{b}{\cdot} \frac{b}{\cdot}$	$\frac{+}{\cdot} \frac{+}{\cdot} \frac{he}{he}$ $\frac{+}{\cdot} \frac{+}{\cdot} \frac{he}{he}$	$\frac{ml}{ml} \frac{+}{\cdot} \frac{he}{he}$ und $\frac{ml}{ml} \frac{b}{\cdot} \frac{he}{he}$ $\frac{ml}{ml} \frac{b}{\cdot} \frac{he}{he}$	$\frac{+}{\cdot} \frac{b}{\cdot} \frac{he}{he}$ $\frac{+}{\cdot} \frac{b}{\cdot} \frac{he}{he}$
Befund . .	1151	494	357	269	135	77
Spaltzahl .	29,7	12,7	9,2	6,9	3,5	1,9
<i>E</i> ± <i>mE</i> . .	27 ± 0,63	12 ± 0,46	9 ± 0,44	9 ± 0,44	4 ± 0,32	3 ± 0,27

In den *Entwicklungsgeschwindigkeiten* zeigen sich charakteristische Unterschiede. Von den Phänotypen sind die Schwarzschuppigen gegenüber den Wild-

farbigen und den Musterlosen beschleunigt, die Tiere mit *he/he* und *b/b*; *he/he* sind den Wildfarbigen gegenüber verlangsamt (Abb. 4). Das entspricht früheren Befunden über die Wirkung von *b* und *he* auf die Entwicklungsgeschwindigkeit (KÜHN 1939, SCHWARTZ 1941).

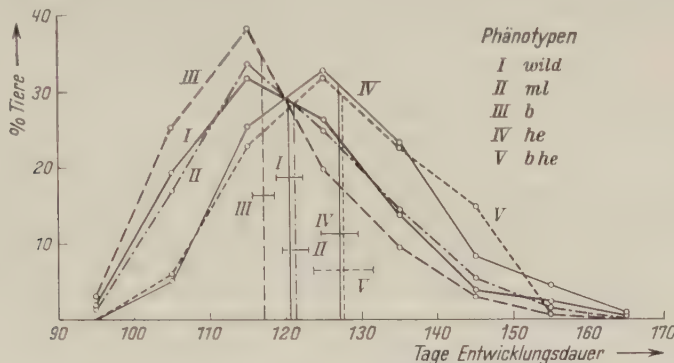


Abb. 4. Entwicklungsdauer der Phänotypen in $F_3 \left(\begin{smallmatrix} + & + & + \\ ml & b & he \end{smallmatrix} \right)^*$. Mittelwerte und Spielräume ± 3 m

Literatur

KÜHN, A.: Entwicklungsphysiologische Wirkungen einiger Gene von *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **20**, 974 (1932). — Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an *Ephestia kühniella*. Z. Vererbungslehre **67**, 197 (1934). — Vollständige Unterdrückung des Zeichnungsmusters durch eine Mutation der Mehlmotte *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **27**, 597 (1939). — Über die Mutation *he* (gehemmte Ausfärbung) bei *Ephestia kühniella*. Z. Vererbungslehre **77**, 337 (1939). — Zur Entwicklungsphysiologie der Schmetterlingsschuppen. Biol. Zbl. **61**, 109 (1941). — KÜHN, A., u. K. HENKE: Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ZELLER. I.—VII. Abh. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl., N. F. **15**, 1 (1929). — Über einen Fall von geschlechtsgekoppelter Vererbung mit wechselnder Merkmalsausprägung bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ZELLER. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl., Biol. **1**, 247 (1935). — Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ZELLER. Abh. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl., N. F. **15**, 244 (1936). — SCHWARTZ, V.: Über die Manifestierung der Mutation *he* in Abhängigkeit vom genotypischen Milieu bei *Ephestia kühniella* ZELLER. Biol. Zbl. **61**, 478 (1941). — SEEGER, H.: Genetische Untersuchungen an der neuen Mutation „helles Umfeld“ (*Hu*) der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ZELLER. Z. Vererbungslehre **86**, 545 (1955).

Prof. Dr. ALFRED KÜHN, Max-Planck-Institut für Biologie,
Tübingen, Spemannstr. 34

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

DIE AUSLÖSUNG VON MUTATIONEN DURCH CHEMIKALIEN BEI *ANTIRRHINUM MAJUS*

Von

FRIEDRICH OEHLKERS

(Eingegangen am 20. April 1956)

Im Jahre 1943 wurde von uns der Nachweis erbracht, daß verschiedene Chemikalien bei geeigneter Applikation die Wirkung haben, Mutationen auszulösen. Als Test wurde dabei das Auftreten neuer Chromosomentranslokationen bei *Oenothera* verwendet. Diese Versuche, obwohl sie durch zahlreiche eigene und solche verschiedener Mitarbeiter später ergänzt sind, wurden — besonders von den zoologischen Genetikern (vgl. AUERBACH 1949 und NACHTSHEIM 1955) — kaum beachtet. Vermutlich werden die realen Chromosomenmutationen von der Zoologie immer noch nicht als „echte Mutationen“ angesehen, obwohl die Beziehungen zwischen sichtbaren Mutanten und Chromosomenveränderungen auch bei *Drosophila* weitgehend geklärt sind. Eine ernsthafte Auseinandersetzung mit meinen Versuchen erfolgte allein durch VOGT 1948 und 1950 sowie durch JENSEN, KIRK, KÖRMARK und WESTERGAARD 1949—1953. Die Ergebnisse beider Arbeitsgruppen ließen es wünschenswert erscheinen, mit den von uns verwendeten Chemikalien Mutationsversuche anzustellen, die über den chromosomalen Effekt hinausgehen und an Außenmerkmalen auch der höheren Pflanzen kenntlich werden. Es kommt hinzu, daß sich von uns (OEHLKERS 1953) hat nachweisen lassen, daß eine Abstufung in der Spezifität der Einwirkung bei chromosomalen Mutationen besteht. Eine völlig zufällige Verteilung der Angriffsorte findet sich bei der Anwendung von Röntgenstrahlen und gewissen organischen Substanzen. Die nachdrücklichsten Abweichungen zeigen anorganische Substanzen, insbesondere die Schwermetallsalze. So ist es also denkbar, daß sich auch bei der Abspaltung phänotypisch sichtbarer Mutanten Unterschiede ergeben. Ob sich solche Differenzen freilich *beweisen* lassen, ist eine andere Frage; es wäre schon ein Fortschritt, wenn sich wenigstens ein *Hinweis* fände.

Material und Methode

Als Material wurde *Antirrhinum majus* Sippe 50 verwendet. Wir hatten uns Saatgut davon schon vor langer Zeit noch aus Müncheberg von STUBBE¹ kommen lassen, zunächst als Demonstrationsmaterial. Als wir dann damit zu arbeiten begannen, stellte sich freilich heraus, daß unsere Linie eine ganz besonders hohe spontane Mutationsrate besaß. Darum ließen wir uns zum Vergleich sowohl aus Gatersleben von STUBBE als auch aus Voldagsen von RUDOLF neues Vergleichsmaterial kommen, das sich jetzt noch in Bearbeitung befindet. Inzwischen ergab sich freilich, daß unsere Befürchtung, die unmäßig erhöhte Mutationsrate möchte mit der Einwirkung örtlicher äußerer Verhältnisse zusammenhängen, kaum zutreffen kann; denn wir haben aus unserem alten Material inzwischen eine Linie isolieren können, die wieder die geringe Mutationsrate der ursprünglichen Sippe 50 besitzt. Unsere erste Versuchsreihe freilich

¹ Den Herren Kollegen STUBBE und RUDOLF sei bestens für die Überlassung des Materials gedankt.

(1949 begonnen) ist durch die Verwendung der hochmutierenden Sippe um ihren Beweiserfolg gebracht. Es mußte alles mit der „normal mutierenden“ Sippe wiederholt werden.

Die Weise der Applikation, die hauptsächlich verwendet wurde, ist schon früher (OEHLKERS 1946) beschrieben worden. Kurz zusammengefaßt verfahren wir wie folgt. Die Pflanzen wurden in der üblichen Weise kultiviert und ins Freiland ausgepflanzt oder in Töpfen aufgezogen. Nach Bildung der Infloreszenz wurde der Hauptsproß bis zur Hälfte quer eingeschnitten und dann von unten herauf so weit aufgespalten, bis sich ein genügend langes Ende des Stengels in ein darunter geschobenes Reagenzglas hineinstecken ließ, so daß eine darin befindliche Lösung aufgesogen werden konnte, um mit dem Transpirationsstrom in die Blüten befördert zu werden. Nach mehreren Stunden wurden die Lösungen entfernt und die Gläser mit Wasser gefüllt. Für die Versorgung der Infloreszenz reicht übrigens auch die noch mit den Wurzeln in Verbindung stehende Stengelhälfte aus. STANGE hat 1951 nachgewiesen, daß Lithium- und Cäsiumchlorid bei *Oenothera* verschieden lange braucht bis zur spektroskopischen Nachweisbarkeit in den Knospen, nämlich zwischen 6 und 12 Std, wobei noch die etwas abseitigen Bedingungen der Kältekammer mit 10° C, abgeschnittene Infloreszenzen und die Differenz in der sicheren Nachweisbarkeit der Substanzen mit einzurechnen sind. Jedenfalls besteht kein Zweifel darüber, daß unter allen Umständen nach 24 Std auch die Antheren der Knospen hinreichend durchtränkt sind. Allerdings hat sich später herausgestellt, daß eine so lange Behandlung mit verschiedenen Chemikalien giftig wirken kann und daß dann nur wenige der behandelten Pflanzen am Leben bleiben. Indessen ist wohl sicher, daß ein einmal in den Transpirationsstrom gebrachtes „Substanzpaket“ auch mit diesem aufsteigt und weiterbefördert wird, ebenso wie das „Wärmepaket“ in HUBERS Versuchen im Transpirationsstrom weiterrückte und meßbar wurde. Bei den ersten Experimenten wurde schließlich eine Lösung von m/10 Äthylurethan + m/200 KCl verwendet. Eine Einwirkungs-dauer von 33 Std ließ nur 3 Pflanzen von 25 am Leben, bei 7stündiger Einwirkung überlebten alle Pflanzen. Abgesehen davon wurde noch eine Lösung von m/1000 Morphinum hydrochloricum verwendet. Von diesen beiden Einwirkungen erfolgten im Jahre 1950 die Aufzuchten der F₁ und 1951 die der F₂. Obwohl die Applikationsmethode in den ersten Versuchen nicht zu einem vollständigen Beweis führte, hat sie sich späterhin durchaus bewährt.

Noch eine zweite Methode wurde versucht. Man könnte daran denken, in Analogie zu Röntgenversuchen, wobei reifer Pollen verschiedenen Röntgendosen ausgesetzt wird und dann unmittelbar zur Bestäubung gelangt, Pollenkörner direkt mit Chemikalien zu behandeln. Dieses Verfahren wurde entweder so durchgeführt, daß der Pollen in die Lösung für etwa 15 min getaucht und dann wieder getrocknet wurde, worauf dann Bestäubungen damit durchgeführt wurden. Verwendet wurden Äthylurethan m/4 + KCl m/200 + 10% Zucker sowie Äthylurethan m/100 + KCl m/200 + 10% Zucker. Eine andere Weise der Anwendung erfolgte so, daß Äthylurethan m/10 + KCl m/200 + 30% Zucker und Spuren von Borsäure einem normalen Agar zugesetzt wurden. Der Pollen wurde darauf ausgestreut und nach 8 und 24 Std zum Bestäuben verwendet. Beide Anwendungsweisen wurden noch mit Morphinum hydrochloricum durchgeführt. Alle diese Versuche mit dem direkt beeinflussten Pollen erwiesen sich als recht unzulänglich. Trotzdem haben wir sie hier ausführlich beschrieben, weil es denkbar wäre, daß solche Erfahrungen doch einige Bedeutung haben.

Zwischen dem Anschneiden der Pflanzen sowie dem Beginn der Chemikalienbehandlung und dem Aufblühen der Knospen, in die die Substanzen während der Meiosis hineingelangen, lagen stets 10–12 Tage. Bis zu 12 Blüten der behandelten Pflanzen wurden zu Bestäubungen verwendet, meistens gelangen 7–10. Die F₁-Pflanzen wurden im folgenden Jahr aufgezogen und geselbstet und im weiteren Jahr die F₂ herangezogen. 30–40 F₂-Pflanzen einer einzelnen geselbsten F₁-Pflanze mußten genügen, bei dem geringen zur Verfügung stehenden Raum, um eventuelle Spaltungen zu beobachten.

Bei unserer zweiten größeren Versuchsserie, die dann schon mit Hilfe der Forschungsgemeinschaft ins Werk gesetzt wurde, wurden folgende Substanzen verwendet: m/10 Äthylurethan + m/200 KCl; m/100 Äthylurethan + m/200 KCl; m/1000 Äthylurethan + m/200 KCl; m/100 Nickelnitrat; m/100 Aluminiumchlorid; m/100 Coffein; 0,01% Thymonucleinsäure + m/100 KCl. (Die Säure wurde in 5 mol n/10 KOH gelöst, mit 5 mol n/10 HCl neutralisiert [Merkindikator p_H 7] und auf die angegebene Konzentration verdünnt.) Aqua dest.; m/1000 Stickstofflost; m/100 KCl.

Die mit m/100 Nickelnitrat behandelten Ausgangspflanzen waren soweit geschädigt, daß sie zwar nicht abstarben, dennoch aber restlos sterilen Pollen entwickelten, was sich erst durch den ausgebliebenen Kreuzungserfolg herausstellte. Ferner wurden im Anschluß an die Behandlung mit m/100 Coffein, 0,01 % Thymonucleinsäure, Aqua dest. und m/100 KCl zwar F₁-Pflanzen gewonnen, doch in so geringer Anzahl, daß sich eine weitere Aufzucht nicht lohnte. Von den übrigen erhielten wir genügend Material, um F₂-Pflanzen in ausreichender Menge zu kultivieren.

Resultate der 1. Versuchsserie

Aus den im methodischen Teil angeführten Gründen hat es keinen Sinn, sich länger über die Einzelheiten der 1. Serie zu verbreiten. Es seien nur folgende Zahlen angegeben. Nach einer Einwirkung von $\frac{1}{10}$ mol Äthylurethan + $\frac{1}{200}$ mol KCl sind auf 372 Nachkommenschaften 15 Mutanten gefunden worden. Das entspricht einem Prozentsatz von 3,9. Ferner: Durch Einwirkung von $\frac{1}{1000}$ mol Morphinium hydrochloricum wurden auf 191 Nachkommenschaften 12 Mutanten gefunden, das entspricht einem Prozentsatz von 5,9. Beide Werte würden durchaus positiv die mutationsauslösende Wirkung der Chemikalien kennzeichnen, wenn nicht die für diese Versuche verwendete Kontrollsippe 50 einen Prozentsatz von 3,7 Mutanten besessen hätte. So ist also der Morphiniumwert gerade eben an der Grenze der Sicherung, der Wert für Äthylurethan dagegen noch nicht. Der normale Prozentsatz von Mutanten in der Sippe 50 beträgt rund 1,8%; dieser vorausgesetzt wäre also mit der 1. Serie der Beweis schon da gewesen. Wir haben aber, wie ich bereits mitteilte, eine 2. Serie von Versuchen angesetzt, und über die soll nun berichtet werden.

Resultate der 2. Versuchsserie

In der 2. Versuchsserie und auch weiterhin hat sich herausgestellt, daß wir aus dem alten Material wieder eine Sippe 50 isolieren konnten, die einen Prozentsatz von 1,82 % Mutanten abspaltet. Es wurde nun sorgfältig darauf geachtet, daß die neuen Versuche mit Pflanzen dieser Linie angesetzt wurden und die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß für die darin enthaltenen Einwirkungen der *P*-Wert gegenüber der Sippe 50 durchaus eine Sicherung im Ansteigen der Mutationsrate anzeigt. Bemerkenswert ist dabei, daß bei der Einwirkung von $\frac{1}{10}$ mol Äthylurethan + KCl ein Wert von 7,36 % erreicht wird, bei $\frac{1}{100}$ mol 6,40 %, bei $\frac{1}{1000}$ mol dagegen wieder 9,24 %. Diese Unsicherheit ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß es von sehr vielen und zum Teil unüberwachten Einzelfaktoren abhängig ist, ob und wieviel Substanz bis zu den Pollenkörnern gelangt.

Tabelle 1

Substanz	Aufgezogene Nachkommenschaften	Spaltende Nachkommenschaften	Prozent der spaltenden Nachkommenschaften	<i>P</i> -Wert gegenüber Sippe 50
m/10 Äthylurethan + m/200 KCl	442	32	7,36	0,028
m/100 Äthylurethan + m/200 KCl	515	33	6,40	0,07
m/1000 Äthylurethan + m/200 KCl	302	28	9,24	0,023
m/100 Aluminiumchlorid	394	25	6,25	0,025
m/1000 Stickstofflost	109	10	9,17	0,017
Sippe 50	110	2	1,82	

Immerhin ist damit klar bewiesen, daß einige der von mir in meinen früheren Arbeiten verwendeten Substanzen mutationsauslösende Wirkung bei Pflanzen auch in dem Sinn haben, daß sichtbare Veränderungen in klaren Spaltungsverhältnissen auftreten (vgl. AUERBACH 1949, S. 372 und OEHLKERS 1949, S. 9).

Diskussion der Ergebnisse

Eine Auseinandersetzung mit den Arbeiten von VOGT 1948 und 1949 und mit denjenigen von JENSEN, KIRK, KÖLMARK und WESTERGAARD ist noch notwendig. VOGT hat gefunden, daß bei Injektion von Urethan in das Abdomen männlicher *Drosophila*-Fliegen eine beträchtliche Erhöhung der Mutationsrate erzielt werden kann. Eine zytologische Untersuchung der Speicheldrüsenchromosomen von entsprechenden Heterozygoten zeigte sodann, daß eine Reihe davon sichtbare Chromosomenveränderungen aufwiesen. Die Arbeiten von VOGT stellen also nicht nur eine Bestätigung unserer früheren Befunde dar, sie schaffen zugleich auch die Verbindung mit der hier vorliegenden Arbeit.

Anders ist es mit der 2. Gruppe von Arbeiten, denjenigen von JENSEN, KIRK, KÖLMARK und WESTERGAARD, die sich mit *Neurospora crassa* befaßt haben. In mehreren Arbeiten wird mitgeteilt, daß die Einwirkung von Äthylurethan keinen Effekt auf die Rückmutationsrate der Mutante „adenineless“ habe. Nun lassen sich diese Versuche freilich nicht mit den unsrigen vergleichen und zwar aus folgenden Gründen. Einmal ist nicht angegeben, ob die Autoren das Urethan-KCl-Gemisch verwendet haben oder allein reines Urethan, und zum anderen ist die Berechnung der Mutationsrate eine vollkommen andere als das bei Tieren (*Drosophila*) und höheren Pflanzen möglich ist. Die Mutationsrate wird auf die behandelten Conidien bezogen und nicht auf die überlebenden. Da sich die Anzahl der behandelten Fortpflanzungskörper (Conidien) bei *Neurospora* feststellen bzw. innerhalb klarer Fehlergrenzen abschätzen läßt, so ist mit dieser Beziehungsweise die unschätzbare Möglichkeit gegeben, den Fehler auszuschalten, der durch eine Empfindlichkeitsdifferenz zwischen den behandelten „adenineless“- und rückmutierten „wild-type“-Conidien gegenüber der Giftwirkung der wirksamen Substanzen entstehen kann.

Bezieht man nun nach den Versuchen von JENSEN, KIRK, KÖLMARK und WESTERGAARD (1951) die Mutationsrate auf die überlebenden Conidien, so erhält man auch für die Einwirkung von Urethan eine erhebliche Rückmutationsrate. Berücksichtigt man dann dabei den Unterschied in der Empfindlichkeit beider Stämme des Wildtyps und der „adenineless“-Mutante gegenüber der Giftwirkung des Urethan und bezieht die Zahl der Rückmutationen auf die Zahl der behandelten Conidien, dann bleibt dennoch eine etwa 6fache Erhöhung der Mutationsrate übrig, die aber gegenüber anderen Substanzen, die in den Versuchen der Autoren verwendet und als positiv bewertet werden, in der Tat gering ist, für eine statistische Sicherung freilich genügen dürfte. Die Festsetzung der hier verlangten sehr hohen Mutationsrate als Sicherungsgrundlage ist eben eine willkürliche und zudem mit steigender Giftwirkung des Agens ansteigende. Bei 90% absterbenden Conidien müßte die Mutationsrate das 50fache der Kontrolle erreichen, um von den Autoren noch als mutagen anerkannt zu werden! So scheint es mir auch nicht notwendig zu sein, eine besondere Interpretation für die positiven Befunde einerseits von uns bzw. VOGT und

diejenigen der Autoren zu geben, die sich mit *Neurospora* beschäftigten. Indessen liegt den *Neurospora*-Autoren auch schon die Möglichkeit im Sinn, es könnte sich um eine Spezifität der Wirkung handeln (KÖLMARK 1953). Wir konnten für diese Möglichkeit (OEHLKERS 1953) einen zytologischen Hinweis bringen. Wieweit sich eine Spezifität wirklich bei *Antirrhinum*-Mutationen feststellen lassen wird, bleibt späterer Erörterung vorbehalten. Über die Erfolge der weiteren Untersuchungen über die Mutationsauslösung durch Chemikalien werden meine Mitarbeiter später berichten, ebenso über die eben erörterten Probleme sowie über die Entwicklungsgeschichte der Mutanten.

Zusammenfassung

Es wurden Versuche gemacht, Mutationen durch Einwirkung von Chemikalien bei *Antirrhinum majus* auszulösen. Ein Erfolg ist durch das Äthylurethan-KCl-Gemisch, Aluminiumchlorid sowie Stickstofflost zu verzeichnen.

Eine Auseinandersetzung mit den Versuchen anderer Autoren ist gegeben worden.

Jeder Übergang auf ein neues Versuchsobjekt ist mit Schwierigkeiten verbunden. Darum haben diese Versuche an *Antirrhinum* so sehr viel Zeit verschlungen. Ich habe verschiedenen Mitarbeitern zu danken: Fräulein Dr. G. LINNERT, Herrn R. BERGFELD, Fräulein G. KOHLWEY, Fräulein U. EBELL und Fräulein I. NEUGEBAUER. Besonderen Dank habe ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft abzustatten, ohne deren tatkräftige Unterstützung die Versuche erfolglos hätten abgebrochen werden müssen.

Literatur

- AUERBACH, CH.: Chemical production of mutations. *Nature* (Lond.) **157**, 302 (1946). — Chemically induced mosaicism in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* **66**, 211—222 (1946). — Chemical mutagenesis. *Biol. Rev.* **24**, 355—391 (1949). — Differences between effects of chemical and physical mutagens. *Pubbl. Staz. zool. Napoli* **1950**, 1—23. AUERBACH, CH., and J. M. ROBSON: Production of mutations by Allyl-Isothiocyanate. *Nature* (Lond.) **154**, 81 (1944). — The production of mutations by chemical substances. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, Sect. B.* **62**, 271—283 (1947). — Tests of chemical substance for mutagenic action. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* **62**, 284—291 (1947). — The chemical production of mutations. *Science* (Lancaster, Pa.) **105**, 243—247 (1947). — BAUR, E.: Mutanten von *Antirrhinum*. *Z. Vererbungslehre* **27**, 241 (1922). — Untersuchungen über das Wesen, die Entstehung und die Vererbung von Rassenunterschieden bei *Antirrhinum majus*. *Bibliogr. genet.* ('s-Gravenhage) **4** (1924). — DEUFEL, J.: Auslösung von Chromosomenmutationen durch Äthylurethan. *Chromosoma* **4**, 611—620 (1952). — DÖRING, H.: Über den Einfluß der Ernährung auf die Mutationshäufigkeit bei *Antirrhinum majus*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **55**, 167—182 (1937). — FISHER, R. A.: Statistical methods for research workers. London: Oliver & Boyd 1938. — JENSEN, K. A., J. KIRK, G. KÖLMARK and M. WESTERGAARD: Chemically induced mutations in *Neurospora*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 245—259 (1951). — JENSEN, K. A., G. KÖLMARK u. M. WESTERGAARD: Back-mutations in *Neurospora crassa* induced by diazomethane. *Hereditas* (Lund) **35**, 521—525 (1949). — KÖLMARK, G.: Differential response to mutagens as studied by the *Neurospora* reverse mutation test. *Hereditas* (Lund) **39**, 270—276 (1953). — KÖLMARK, G., u. M. WESTERGAARD: Further studies on chemically induced reversions at the adenine locus of *Neurospora*. *Hereditas* (Lund) **39**, 209—224 (1953). — LINNERT, G.: Die Einwirkung von Chemikalien auf die Meiosis. *Z. Vererbungslehre* **83**, 422—428 (1950). — MARQUARDT, H.: Auswertung eines Versuches zur Auslösung von Chromosomenmutationen durch ein Äthylurethan-Kaliumchlorid-Gemisch. *Experientia* (Basel) **5**, 1—2 (1949). — NACHTSHEIM, H.: Die Genetik als Brückenwissenschaft. *Jb. 1954 der Max-Planck-Ges. zur Förderung der Wissenschaft.* Göttingen 1955. — OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von

Chemikalien. Z. Vererbungslehre **81**, 313—341 (1943). — Weitere Versuche zur Mutationsauslösung durch Chemikalien. Biol. Zbl. **65**, 176—186 (1946). — Mutationsauslösung durch Chemikalien. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., 9. Abh. **1949**, 373—410. — OEHLKERS, F., u. G. LINNERT: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Vererbungslehre **83**, 136—156 (1949). — Weitere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Vererbungslehre **83**, 429—438 (1951). — OEHLKERS, F., u. H. MARQUARDT: Die Auslösung von Chromosomenmutationen durch Injektion wirksamer Substanzen in die Knospen von *Paeonia tenuifolia*. Z. Vererbungslehre **83**, 299—317 (1950). — PÄTAU, K.: Eine neue χ^2 -Tafel. Z. Vererbungslehre **80**, 558—564 (1942). — STANGE, L.: Untersuchungen über den Einfluß von Begleitfaktoren auf die mutationsauslösende Wirkung der Röntgenstrahlen. Z. Vererbungslehre **83**, 485—512 (1951). — STUBBE, H.: Genmutationen. In Handbuch der Vererbungswissenschaft. Berlin 1938. — STUBBE, H., u. H. DÖRING: Untersuchungen über experimentelle Auslösung von Mutationen bei *Antirrhinum majus* VII. Über den Einfluß des Nährstoffmangels auf die Mutabilität. Z. Vererbungslehre **75**, 341—357 (1938). — VOGT, M.: Mutationsauslösung bei *Drosophila* durch Äthylurethan. Experientia (Basel) **4**, 68—69 (1948). — Analyse durch Äthylurethan bei *Drosophila* induzierter Mutationen. Z. Vererbungslehre **83**, 324—340 (1950).

Prof. Dr. FRIEDRICH OEHLKERS,
Freiburg i. Br., Botanisches Institut, Schänzlestr. 9—11

Aus dem Max-Planck-Institut für Physikalische Chemie, Göttingen

DIE BEDEUTUNG DES ZWEIFARB-NÄHRBODENS FÜR GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AM BAKTERIOPHAGEN T 1

Von

CARSTEN BRESCH und THOMAS TRAUTNER

Mit 6 Textabbildungen, davon 5 farbigen Teilfiguren

(Eingegangen am 16. Februar 1956)

Genetische Arbeiten mit Bakteriophagen werden dadurch erschwert, daß nur eine begrenzte Zahl von Merkmalen zur Verfügung steht, die nebeneinander direkt aus dem Charakter der Phagenkolonie abgelesen werden können, ohne daß die Ausprägung eines Merkmals die Erkennung anderer verhindert. Obwohl bei allen eingehend untersuchten Phagen eine große Zahl von Mutationen beobachtet wurde, sind es im wesentlichen nur 3 Merkmalsgruppen, die nebeneinander benutzt werden können.

1. Randbreiten-Mutationen

Die bekannteste dieser Art ist die „*rapid*“-Mutation des Phagen T 2 (analog bei T 4 und T 6). Diese zeigt im Gegensatz zum Wildtyp, der ein kleines unscharfes Loch bildet, einen breiten Hof mit scharf begrenztem Rand. Die Änderung des Lochtyps ist in diesem Falle und vermutlich bei allen derartigen Mutationen durch eine Änderung der physiologischen Eigenschaften des Phagen bedingt. Während beim Wildtyp die Superinfektion eines bereits infizierten Bakteriums eine Verlängerung der Latenzperiode (lysis inhibition) hervorruft, kommt es bei der *rapid*-Mutante trotz Superinfektion zur Lyse nach normaler Zeit (DOERMANN 1948). Beim Phagen T 1 bildet der Wildtyp große breitrandige Löcher. Dementsprechend werden hier umgekehrt Mutanten beobachtet, die wie z. B. T 1 *Rm* oder T 1 *Vs* kleinere Kolonien mit nur schmalen Rand erzeugen (Genbezeichnungen bei BRESCH und MENNIGMANN 1954). Die physiologischen Ursachen hierfür wurden bisher noch nicht untersucht, es besteht jedoch weder ein Unterschied in der Länge der Latenzperiode noch in der Wurfgröße zwischen dem Wildtyp und dem *Rm*-Typ.

2. „Host range“ (Wirtsbereichs)-Mutationen

Diese bei fast allen Phagen beobachtete Mutation erweitert die Spezifität des Phagen für neue Wirtsstämme. Während sich der Wildtyp des Phagen T 1 z. B. in *E. coli* B, nicht aber in dessen Mutante B/1, die durch Selektion mit T 1 gewonnen wurde, vermehrt (die Bezeichnung des Bakterienstammes B/1 symbolisiert diesen Sachverhalt), ist die Wirtsbereichsmutante von T 1 (als T 1 *Hr* bezeichnet) in der Lage, beide Bakterienstämme anzugreifen. Mit einem doppelten Bakterienrasen (*B* + B/1) kann dieser Unterschied leicht sichtbar gemacht werden. Das Zentrum der Löcher der host range-Mutante ist völlig klar, weil beide Stämme lysiert werden, das des Wildtyps dagegen trübe, d. h. überwachsen von einem dünnen B/1-Rasen.

3. Farbmutationen

Wie bereits früher beschrieben (BRESCH 1952), kann durch einen Zusatz geeigneter Farbstoffe zum Nähragar der Rand einer Phagenkolonie angefärbt werden. Es gelingt, Mutanten zu isolieren, die in ihrer Koloniefärbung erhebliche Abweichungen vom Wildtyp aufweisen. Durch gleichzeitige Benutzung eines gelben und eines blauen Farbstoffes können so beim Phagen T 1 neben den blauen Löchern des Wildtyps kräftig gelbe Kolonien einer Mutante T 1 *Ge* unterschieden werden. Auch andere Typen, so z. B. T 1 *Zf* mit gelbgrünem Innen- und blaugrünem Außenrand, werden beobachtet. Die physiologischen Veränderungen, die derartig unterschiedlichen Färbbarkeiten zugrunde liegen und die durch einen einzigen Mutationsschritt des Phagen bedingt sind, verdienen zweifellos das Interesse des Biochemikers, konnten aber ebenfalls bisher noch nicht untersucht werden.

Die Benutzung von Mutanten dieser 3 Gruppen ermöglichte mit T 1 Phagen eine größere Zahl von Drei-Faktor-Kreuzungen, bei denen sämtliche 8 Genkombinationen einwandfrei unterschieden werden konnten. Ergebnisse solcher Versuche wurden bereits mitgeteilt (BRESCH 1953, 1955, BRESCH und MENNIGMANN 1954, BRESCH und TRAUTNER 1955). Neben den Rekombinantentypen konnten mit Hilfe der Zweifarb-Technik in T 1-Kreuzungen aber auch Lochtypen beobachtet werden, die auf sog. *Heterozygoten* zurückzuführen sind. Heterozygoten wurden zum erstenmal von HERSHEY und CHASE 1951 an T 2 gefunden. Sie wiesen nach, daß es sich bei Heterozygoten um einzelne Phagenpartikel handelt, bei denen ein Teil des Genoms verdoppelt vorliegt. Dieser doppelte Genomabschnitt enthält je ein Allel des als heterozygot erkennbaren Genes. Infizieren solche Partikel ein Bakterium, so vermehren sie sich nicht als Heterozygoten weiter, sondern bringen 2 genetisch verschiedene Typen von Nachkommen hervor. Durch quantitative Untersuchungen dieses Phänomens konnte LEVINTHAL 1954 zeigen, daß Heterozygoten stets Rekombinanten sind in bezug auf die Gene, die rechts und links neben dem heterozygoten Gebiet liegen, also in ihrer Struktur dem Schema der Abb. 1 entsprechen.

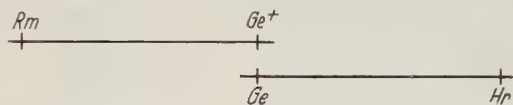


Abb. 1. Schematische Struktur einer Heterozygote nach LEVINTHAL. Überlappung auf dem Gen *Ge*

Bei einer Zwei-Faktor-Kreuzung T 1 *Hr*⁺ *Ge* × T 1 *Hr* *Ge*⁺ (Technik bei BRESCH 1953) treten die Heterozygoten für das *Hr*-Gen (symbolisiert durch $\frac{Hr^+}{Hr}$) und für das *Ge*-Gen ($\frac{Ge^+}{Ge}$) mit gleicher Häufigkeit von etwa 0,2% auf. Die *Ge*⁺/*Ge*-Typen zeigen dabei gewöhnlich Löcher mit Wildtypcharakter, die gelbe Einsprengsel aufweisen (mottled plaques) (s. Abb. 4). Die *Hr*⁺/*Hr* Heterozygote dagegen besteht in einem *Hr*-Loch (innen klar), das einen trüben Außenrand mit Wildtypcharakter trägt (s. Abb. 5). Unter diesen sind etwa 20% für beide Gene heterozygot ($\frac{Hr^+ Ge}{Hr Ge^+}$), was ebenfalls mit Hilfe des Zweifarb-Agars erkennbar ist (s. Abb. 6). So ist diese Technik zu dem entscheidenden Hilfsmittel in der Genetik von T 1 geworden und es erscheint gerechtfertigt, an Hand von Farbphotos ihre Brauchbarkeit zu demonstrieren.

Abb. 2

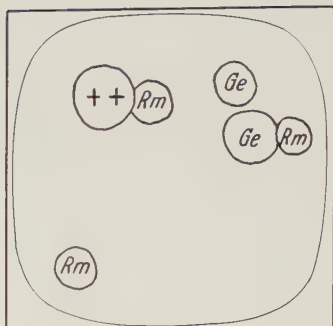
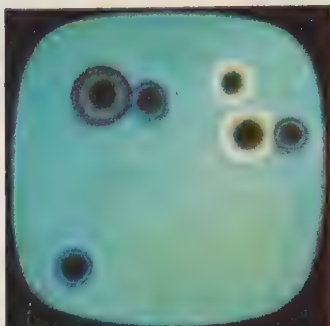


Abb. 3

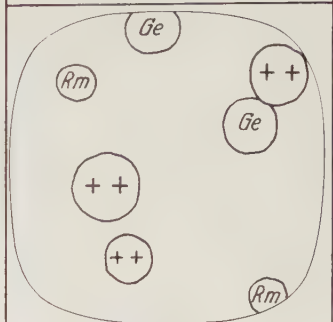
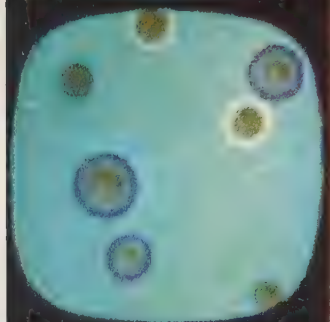


Abb. 4

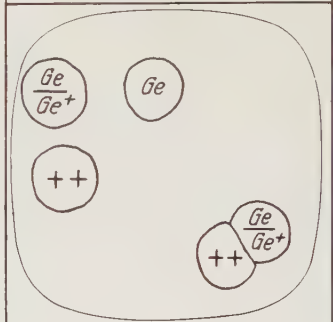
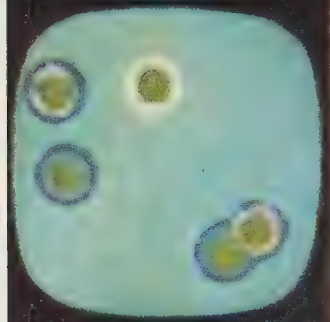


Abb. 5

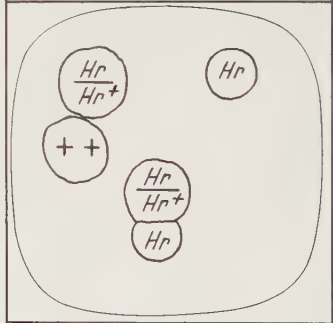
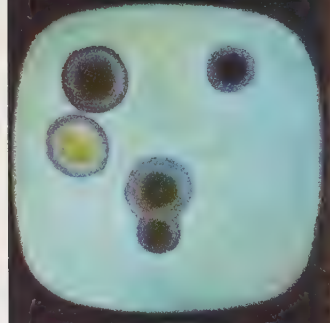
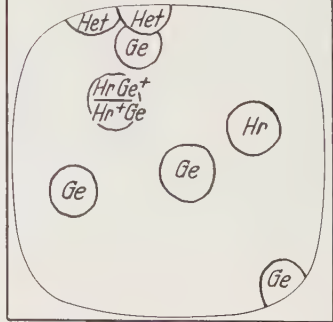
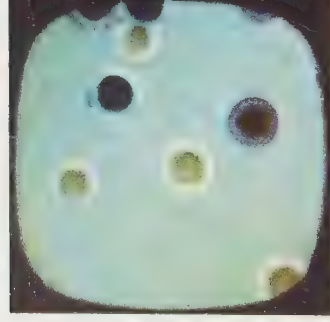


Abb. 6



Technisches

1. *Nährboden.* Zur Herstellung des Zweifarb-Nährbodens werden 1 g Wasserblau (Merck), 6 g Alizarin gelb (Merck), 120 g Glukose in 300 ml Aqua dest. gelöst und zur Sterilisation kurz aufgekocht. Diese Lösung reicht für 10 Liter Agar. Sie wird in entsprechender Menge dem gewöhnlichen flüssigen Nährboden unmittelbar vor dem Gießen der Platten zugesetzt. Diese selbst werden vor der eigentlichen Benutzung etwa 3 Std ohne Deckel umgedreht auf Fließpapier bei 45° C getrocknet. Es besteht hierbei praktisch keine Gefahr der Verunreinigung. Dann werden 0,25 ml Phagen-Bakteriensuspension auf die Platten gegeben und durch leichtes Schwenken möglichst gleichmäßig verteilt (ohne Spatel!).

Der Glucosezusatz bewirkt nach genügendem Bakterienwachstum ein Ansäuern des Nährbodens, was für die Ausbildung einer guten Farbreaktion notwendig ist. Gleichzeitig wird dadurch nach etwa 8 Std jedes weitere Wachstum verhindert, so daß eine Auswertung der Platten noch nach 4 Tagen möglich ist.

Während bei T 1 und auch bei T 7 (unveröffentlicht) der Zweifarb-Nährboden eine große technische Erleichterung darstellt, ist er für kleinflöcherige Phagen wie T 2 leider kaum benutzbar. Durch den Zusatz von Glucose und Farbstoffen nämlich wird die normale Lochgröße erheblich vermindert, was die Differenzierung der ohnehin schon kleinen Löcher unmöglich macht.

Die Ausbildung einer guten Farbreaktion wird bedauerlicherweise offenbar stark von der chemischen Beschaffenheit des Nährbodens beeinflusst. Das weitaus geeigneteste Material ist der Trockenagar der Firma Bram, Berlin-Lichterfelde. Aber auch damit treten erhebliche Unterschiede in einzelnen Herstellungen auf. Trotz großer Bemühungen gelang es bisher nicht, die Ursachen der Empfindlichkeit und die optimalen Bedingungen der Farbreaktion zu klären. Wir wissen nur, daß schon geringe Konzentrationsänderungen von Salzen wie NaCl oder Na_2CO_3 oder Änderung des pH Farbe und Charakter der Phagenkolonie erheblich beeinflussen. Davon kann Gebrauch gemacht werden, um für bestimmte Genkombinationen den geeignetsten Nährboden zu erzielen. Ebenso können die Konzentrationen der Farbstoffe und der Glukose den Anforderungen eines Experimentes angepaßt werden, in dem bestimmte Genkombinationen untersucht werden sollen.

2. *Photographie.* Sämtliche Aufnahmen wurden durch Zeiss Opton Binokular mit Zeiss Photoaufsatz und Robot-Kamera auf Kodachrome Tageslichtfilm K 135 gemacht. Beleuchtung war schräges Auflicht einer Zeiss Winkel Homi HB 200 (Osram) mit einem schwachen Gelbfilter, um natürliche Farbwirkung zu erzielen. Abbildungsmaßstab: alle Photos 2,5mal natürliche Größe.

Wir danken der „Research Corporation“ für ein Stipendium, der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“ für eine Sachbeihilfe, sowie der Firma Kodak AG, Stuttgart für ihre Beratung und Unterstützung bei der Herstellung der Photographien.

Abb. 2. Drei Phagentypen: Wildtyp T 1, Farb-Mutante T 1 *Ge* und Randbreiten-Mutante T 1 *Rm* auf einfachem Bakterienrasen mit *E. coli* B (hergestellt auf Kodachrome-Film)

Abb. 3. Die gleichen 3 Phagentypen wie in Abb. 2, jedoch auf doppeltem Bakterienrasen *B* + *B*/1. Die Löcher erscheinen trübe, da keiner der Phagen den Bakterienstamm *B*/1 lysieren kann (hergestellt auf Kodachrome-Film)

Abb. 4. Wildtyp T 1, Farbmутante T 1 *Ge* und 2 Heterozygoten des Typs *Ge/Ge*⁺, die in dem blauen Ring des Wildtyps gelbe Einsprengsel zeigen. Doppelter Bakterienrasen *B* + *B*/1, also alle Typen überwachsen (hergestellt auf Kodachrome-Film)

Abb. 5. Wildtyp T 1 und Wirtsbereichsmutante T 1 *Hr*, die beide Bakterienstämme lysiert, außerdem aber etwas kleinere und stärker blau gefärbte Löcher bildet. Daneben 2 Heterozygoten *Hr/Hr*⁺: das innen klare *Hr*-Loch zeigt einen breiten Rand, der außen Wildtypcharakter trägt. Bakterien *B* + *B*/1. (hergestellt auf Kodachrome-Film)

Abb. 6. T 1 *Hr* wie in Abb. 5, T 1 *Ge* wie in Abb. 4, dazu doppelte Heterozygoten *Hr Ge*⁺/*Hr*⁺ *Ge*: gelbe trübe Löcher mit trüben blauen Einsprengseln, in deren Mitte ein klares blaues *Hr*-Loch liegt. (In Zweifelsfällen werden solche Löcher abgeimpft, in Bakterien *B* + *B*/1 suspendiert und sofort wieder auf Platten gebracht. Die Konstitution der Heterozygote kann dann aus dem Auftreten der verschiedenen Gene erschlossen werden.) Bakterien *B* + *B*/1. (Heterozygoten am Bildrand mit „Het“ bezeichnet) (hergestellt auf Kodachrome-Film)

Summary

Three different groups of mutations in bacteriophage are discussed with special reference to the coliphage T 1. One of these groups can be detected only by application of the „Zweifarb-Nährboden“. This technique, its advantages, and difficulties are described. Coloured photographs are shown of the most important genetic types of T 1 and of some heterozygotes which appear in genetic crosses.

Literatur

BRESCH, C.: Unterscheidung verschiedener Bakteriophagentypen durch Farbindikator-nährböden. Zbl. Bakter. 1 Orig. **159**, 47 (1952). — Genetical studies on bacteriophage T 1. Ann. Inst. Pasteur **84**, 157 (1953). — Zum Paarungsmechanismus von Bakteriophagen. Z. Naturforsch. **10b**, 545 (1955). — BRESCH, C., u. H. D. MENNIGMANN: Weitere Untersuchungen zur Genetik von T 1 Bakteriophagen. Z. Naturforsch. **9b**, 212 (1954). — BRESCH, C., u. TH. TRAUTNER: Zur Kinetik der Rekombinantenbildung bei T 1 Bakteriophagen. Z. Naturforsch. **10b**, 436 (1955). — DOERMANN, A. H.: Lysis and lysis inhibition with *Escherichia coli* bacteriophage. J. of Bacter. **55**, 257 (1948). — HERSHEY, A. D., and M. CHASE: Genetic recombination and heterozygosis in bacteriophage. C.S.H.S.Q.B. **16**, 417 (1951). — LEVINTHAL, C.: Recombination in phage T 2: its relationship to heterozygosis and growth. Genetics **39**, 169 (1954).

CARSTEN BRESCH, Max-Planck-Institut für Physikalische Chemie, Göttingen

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln und dem Laboratoire de Génétique
de la Faculté des Sciences de Paris

DIE INCOMPATIBILITÄTSBEZIEHUNGEN ZWISCHEN GEOGRAPHISCHEN RASSEN VON *PODOSPORA ANSERINA* (CES.) REHM

1. Die genetische Analyse der Semi-Incompatibilität

Von

KARL ESSER

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. März 1956)

I. Einleitung

Als Incompatibilität bezeichnet man jede Hemmung der Gametenvereinigung innerhalb eines Fortpflanzungssystems, die nicht auf Kerndefekten der Gameten beruht (LEWIS 1944). Von Selbst-Incompatibilität oder Selbststerilität sprechen wir, wenn bei einem hermaphroditen Organismus trotz funktionsfähiger Gameten keine Selbstbefruchtung erfolgen kann. Sind 2 hermaphrodite Organismen infolge des Besitzes gleicher Selbststerilitätsallele nicht kreuzbar, so kann man von Kreuzungssterilität sprechen, die auf Selbststerilitätseffekten beruht. Anstelle dieser Umschreibung betont man einfacher das Vorliegen der Unverträglichkeit und spricht von Incompatibilität.

Es erscheint noch notwendig, den Zusammenhang der Incompatibilität mit der Homo- und Heterothallie klarzustellen. Ein homothallischer Organismus kann den gesamten Entwicklungszyklus allein vollziehen, während ein heterothallischer dazu eines Partners bedarf. Es gibt 2 Arten von heterothallischen Organismen, nämlich solche, die entweder nur weibliche oder nur männliche Geschlechtsorgane ausbilden (Diözisten) oder solche, die hermaphrodit und incompatibel sind. Homothallie kann niemals mit Selbst-Incompatibilität verbunden sein.

Bei Pilzen sind bisher nur 2 verschiedene Mechanismen bekannt, die eine Selbstbefruchtung verhindern, nämlich der bipolare und der tetrapolare Incompatibilitätstypus. Während der bipolare bei den Phyco-, Asco- und Basidiomyceten vorkommt, reagieren nach dem tetrapolaren Typus ausschließlich die meisten Basidiomyceten.

Die bipolare Incompatibilität wird durch ein Allelenpaar bestimmt, das entweder als $+/-$ oder als A/a bezeichnet wird. Die Verwendung von $+$ und $-$ erscheint uns logischer, da die Bezeichnung A/a durch die Verwendung des großen Buchstabens A eine Dominanz vortäuscht, die jedoch bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Jeder Stamm dieses Incompatibilitätstypes besitzt entweder den Kreuzungstyp $+$ oder $-$ und ist selbst-incompatibel. Es können nur Myzelien erfolgreich gekreuzt werden, die einen verschiedenen Kreuzungstyp besitzen ($+ \times -$). In einigen Fällen sind multiple Allele des Incompatibilitätsallelenpaares $+/-$ beschrieben worden. Auch hierfür gilt: Ungleiche Kreuzungstypen sind kompatibel, gleiche incompatibel.

Für die tetrapolare Incompatibilität sind 2 Allelenpaare (a_1/a_2 , b_1/b_2) mit teilweise bis zu 100 multiplen Allelen (WHITEHOUSE 1949b) verantwortlich, die

nach dem Dihybridenschema mendeln. Compatibel sind nur die Kreuzungen, in denen die Partner sowohl am *a*- als auch am *b*-Locus heterogen sind. Alle anderen Kombinationen, in denen die Partner an einem oder an beiden Loci homogen sind, sind incompatibel.

Einzelheiten über die verschiedenen Incompatibilitätssysteme und ihr Vorkommen innerhalb der Pilze sind bei HARTMANN (1943), WHITEHOUSE (1949a)

und QUINTANILHA und PINTO-LOPES (1950) angegeben.

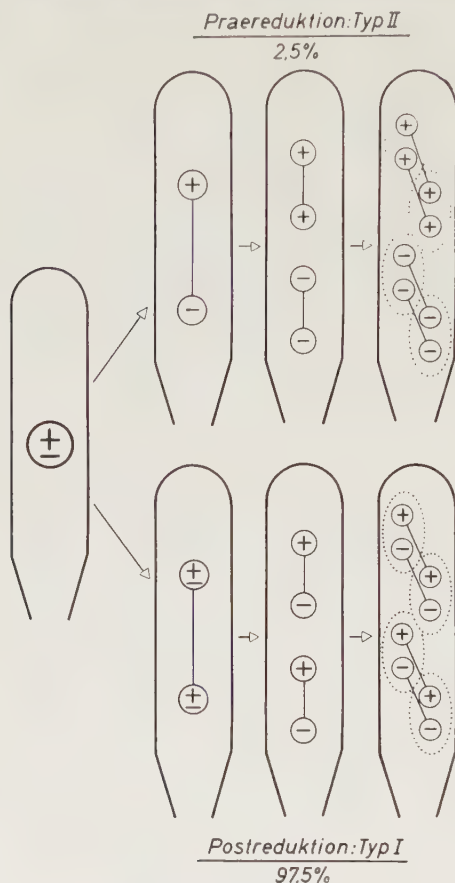
Podospora anserina gehört zum bipolaren Typus der Incompatibilität. Multiple Allele des Genpaares $+/-$ sind bisher nicht aufgefunden worden. Die Entwicklungsgeschichte und die Genetik der Incompatibilität dieses Ascomyceten wurde untersucht von DOWDING (1931), AMES (1932, 1934), DODGE (1936a, 1936b), RIZET (1941a, 1941b, 1941c, 1943), RIZET und ENGELMANN (1949), MOREAU und MOREAU (1951). Die Entwicklungsgeschichte und die Genetik einer achtsporigen *Podospora*-Art (*Bombardia lunata*) ist von ZICKLER (1934, 1952) beschrieben worden. Zum besseren Verständnis der zu schildernden Untersuchungen erscheint uns eine kurze Darstellung der Entwicklungsgeschichte und Genetik von *Podospora* notwendig.

In den jungen Asci erfolgt die Verschmelzung des haploiden männlichen Kerns mit dem haploiden weiblichen. Der diploide Zygotenkern geht sofort in die Meiosis über (s. Abb. 1). Jeder der vier in den 2 Teilungsschritten der Reifeteilung entstehenden Kerne macht noch einmal eine Mitose durch. Danach sind im Ascus 8 Kerne vorhanden. Während in den Teilungen der Meiose die Spindeln in Längsrichtung stehen, liegen sie in der postmeiotischen Mitose schräg zur Ascuslängsachse. Die nach dem Prinzip der freien Zellbildung entstehenden 4 Sporen schließen je 2 Kerne in sich ein, und zwar

Abb. 1. Schematische Darstellung der Entwicklung der Ascosporen bei *Podospora anserina* unter Berücksichtigung der Prä- und Postreduktion des Allelenpaares $+/-$, das für den Kreuzungstyp verantwortlich ist. (Nach RIZET und ENGELMANN 1949, verändert)

sind dies Schwesterkerne der 2. Reifeteilung. Die Kerne einer Spore stammen also von 2 der 4 Meiosisprodukte.

Jedes Merkmal von *Podospora* kann prä- oder postreduziert werden, wie es in Abb. 1 für das Allelenpaar des Kreuzungstyps schematisch dargestellt ist. Der diploide Zygotenkern ist durch Fusion eines männlichen Kerns vom Kreuzungstyp $-$ mit einem weiblichen Kern vom Kreuzungstyp $+$ (oder umgekehrt) entstanden. Wird das Genpaar $+/-$ in der Reduktionsteilung der Meiose aufgeteilt, so sprechen wir von Präreduktion (obere Reihe der Abb. 1,



Typ II). Erfolgt die Trennung aber infolge von crossing-over erst in der Äquationsteilung der Meiose, so ist das Merkmal postreduziert (untere Reihe der Abb. 1, Typ I). Die Insertions-

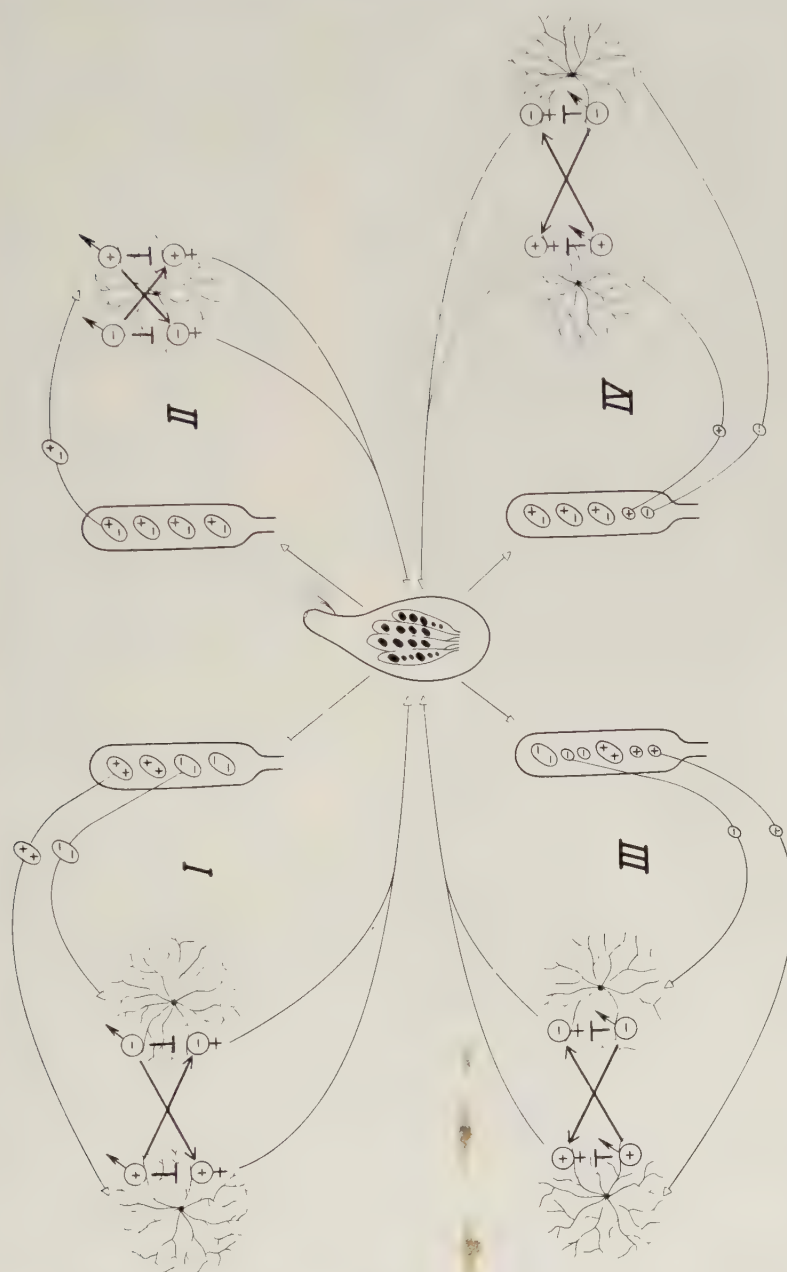


Abb. 2. Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Polyspora anserina*. Ausgehend von einem Perithezium sind die Kernverhältnisse in normalen, viersporigen (I, II) und gemischtsporigen Asci (III, IV) aufgezeichnet. Die Entwicklungszyklen von Doppel- und Einzelsporen sind unter Berücksichtigung der Prä- (I, III) und Postreduktion (II, IV) dargestellt. Nähere Erläuterungen werden im Text gegeben

stellen werden immer präreduziert (LUDWIG 1937, KNAPP 1937, RYAN 1943, TATUM und PERKINS 1950). Bei Präreduktion sind die zweikernigen Sporen, auch Doppelsporen genannt, für den Kreuzungstyp homogen. Bei Postreduktion enthalten alle 4 Sporen des Ascus je

einen $+$ - und je einen $-$ -Kern, sie sind also heterogen für den Kreuzungstyp. Das Allelenpaar $+/-$ wird bei 26°C in 2,5% aller Asci prä- und in den restlichen 97,5% postreduziert. Die hohe Postreduktionsfrequenz kann durch Annahme eines Dauerchiasmas erklärt werden.

Bei Präreduktion von $+$ und $-$ (Abb. 2, I) entwickeln sich aus den $++$ - oder $---$ -Sporen-homocaryotische Myzelien, die männliche und weibliche Geschlechtsorgane, Spermogonien und Ascogone bilden. Die Spermation der $+$ -Spermogonien können die $+$ -Ascogene des eigenen Myzeliums nicht befruchten (blockierter Pfeil). Sie werden nicht von den Trichogynen der Ascogone aufgesucht. Gelangt ein $+$ -Spermatium zufällig an eine $+$ -Trichogyne

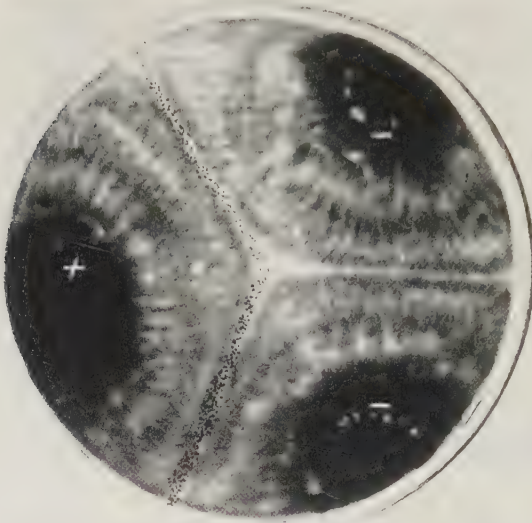


Abb. 3 I—III. Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen selbstincompatiblen, hermaphroditen Myzelien von *Podospora anserina*. I. Normaler Kontakt, bei entgegengesetztem Kreuzungstyp Compatibilität

so erfolgt keine Verschmelzung der beiden. Das gleiche gilt für die $-$ -Spermation und $-$ -Ascogene (blockierter Pfeil). Die beiden homocaryotischen und hermaphroditen Myzelien sind selbstincompatibel. Eine Befruchtung kann nur zwischen Geschlechtsorganen von ungleichem Kreuzungstyp erfolgen ($+\text{♀} \times -\text{♂}$; $-\text{♀} \times +\text{♂}$; s. Pfeile), die Trichogynen suchen die Spermation vom entgegengesetzten Kreuzungstyp auf und diese entleeren ihren Inhalt in die Trichogyne. Der Spermationkern wandert in das einkernige Ascogon ein. Die leere Spermationshülle ist noch an der Trichogyne einige Zeit zu erkennen. Das Ascogon, das schon vor der Befruchtung von Hüllhyphen umgeben war und so zum Protoperithezium geworden ist, entwickelt sich dann zu dem typischen gänsehalsförmigen Perithezium.

Bei Postreduktion des Kreuzungstyps (Abb. 2, II) entstehen aus den $+/-$ -Doppelsporen hete-

rocaryotische Myzelien, die männliche $+$ - und $-$ - und weibliche $+$ - und $-$ -Geschlechtsorgane bilden. Die Befruchtung erfolgt bei diesen selbstfertilen Myzelien nur zwischen Organen von ungleichem Kreuzungstyp (wie schon für Abb. 2, I beschrieben wurde). Auf Grund der hohen Postreduktionsfrequenz von $+/-$ sind fast alle Myzelien aus Doppelsporen selbstfertil. Deswegen wurde *Podospora* lange Zeit, ehe man die cytologischen Verhältnisse bei der Sporenbildung (s. Abb. 1) kannte, irrtümlicherweise als homothallisch bezeichnet.

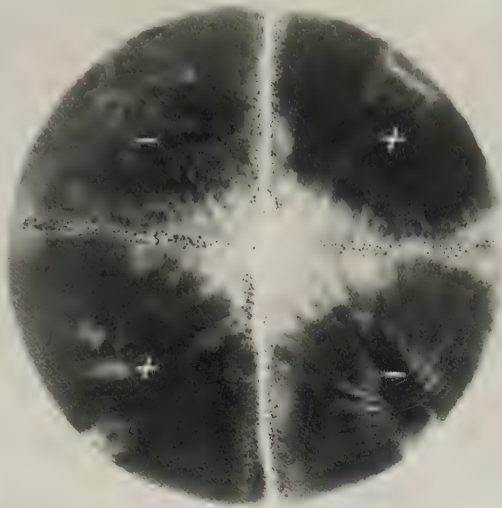
In 1—2% aller Asci bilden sich statt einer zweikernigen Doppelspore 2 kleine Sporen. Diese Einzelsporen besitzen jeweils nur einen Kern. Solche gemischtsporigen Asci enthalten 5 Sporen, nämlich 3 Doppelsporen und 2 Einzelsporen (s. Abb. 2, rechter unterer Ascus). Es können bei *Podospora* alle möglichen Kombinationen von ein- und mehrkernigen Sporen auftreten (s. Abb. 2, linker unterer Ascus), wobei natürlich die Gesamtzahl von 8 Kernen im Ascus konstant bleibt. Alle Myzelien aus Einzelsporen sind homocaryotische, selbstincompatible Zwitter und enthalten nur Kerne vom $+$ - oder $-$ -Kreuzungstyp. Sie sind in keiner Weise von Myzelien zu unterscheiden, die aus $++$ - oder $---$ -Doppelsporen hervorgegangen sind. Bei Präreduktion des Kreuzungstyps (Abb. 2, III) besitzen die Einzelsporenpaare Kerne vom gleichen Kreuzungstyp. Bei Postreduktion des Kreuzungstyps (Abb. 2, IV) sind die Sporen eines Einzelsporenpaares für $+/-$ heterogen.

Ein weiteres Phänomen bei *Podospora anserina* ist die Art der Kontaktbildung, die nach Beimpfen einer Petrischale mit 2 Stämmen auftritt. Es gibt 2 Möglichkeiten des Kontaktes (RIZET 1952). Bei normalem Kontakt wachsen die Hyphen an der Berührungslinie einige Millimeter ineinander und bilden zahlreiche Anastomosen. Haben beide Stämme den ent-

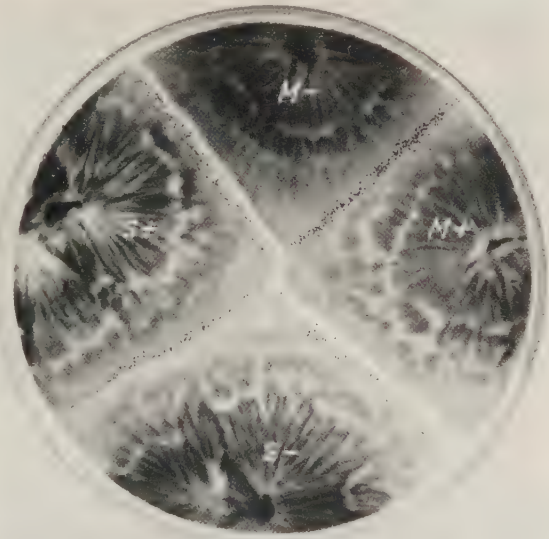
gegegenseetzten Kreuzungstyp, so bildet sich entlang der Kontaktlinie eine Linie von Perithezien (Abb. 3, I), die ein Gemisch der beiden reziproken Kreuzungen $+\varnothing \times -\sigma$ und $-\varnothing \times +\sigma$ sind. Bei der zweiten Art des Kontaktes umschlingen sich die Hyphen der beiden Stämme an der Kontaktlinie und bilden ein dichtes Myzelnetzwerk, das makroskopisch als Wulst zwischen den beiden Stämmen zu erkennen ist. Die Anzahl der Anastomosen zwischen den Hyphen ist geringer als bei normalen Kontakt. Etwa 1 bis 2 mm beiderseits des Wulstes bleiben die Hyphenenden unpigmentiert, so daß zwischen den beiden Partnern eine pigmentfreie Zone zu erkennen ist (Abb. 3, II). Diese Art des Kontaktes wurde Barragebildung (Barrage = Trennungszone) genannt. Wenn die beiden Partner selbstincompatibel sind (z. B. Myzelien aus Einzelsporen) und einen verschiedenen Kreuzungstyp besitzen, bilden sich 2 Linien von Fruchtkörpern, und zwar je eine entlang jeder Seite der Barrage. Die Trichogynen des $+$ -Stammes auf der einen Seite der Barrage wachsen über den Hyphenwulst. Sie können auf der anderen Seite von den $-$ -Spermatien befruchtet werden und umgekehrt. Die Barrage trennt also die beiden reziproken Kreuzungen zwischen selbstincompatiblen Myzelien. Eine solche Barrage mit 2 Linien von Perithezien fand sich bei Gegenüberstellung der Stämme S und s .

Der Stamm s bildet mit dem Stamm M , der eine andere geographische Herkunft besitzt als s , ebenfalls eine Barrage (RIZET 1953). In Kreuzungen selbstincompatibler, homocaryotischer Myzelien ($-M \times +s$ und $+M \times -s$) bildet sich nur eine Linie von Perithezien und zwar auf der Seite von s (Abb. 3, III). Es handelt sich

hierbei um eine *nicht reziproke Inkompatibilität*. Dies konnte mit Hilfe von Spermatisierungen, die eine Unterteilung der Kreuzung $M \times s$ in die beiden



II. Barragebildung, bei entgegengesetztem Kreuzungstyp
Compatibilität



III. Normaler Kontakt und Compatibilität bei Stämmen, die sich nur durch den Kreuzungstyp unterscheiden ($+M \times -M$; $+s \times -s$) und Barragebildung verbunden mit Semi-Inkompatibilität bei Stämmen verschiedener geographischer Herkunft von entgegengesetztem Kreuzungstyp ($+M \times -s$; $-M \times +s$)

reziproken $\text{♀}M \times \text{♂}s$ und $\text{♀}s \times \text{♂}M$ erlauben, bewiesen werden. Wenn man Spermation von M - auf s -Myzelien des entgegengesetzten Kreuzungstyps brachte, so bildeten sich auf den s -Myzelien zahlreiche Fruchtkörper. Im umgekehrten Falle, wenn s -Spermation auf M -Myzelien gegeben wurden, entwickelten sich niemals Perithezien. In der Kreuzung $M \times s$ ist eine Befruchtung der M -Ascogone durch die s -Spermation nicht möglich. Da die Gameten in den Kreuzungen $+M \times -M$ einerseits und $+s \times -s$ anderseits voll funktionsfähig sind (durch Spermatizationen bewiesen), ist das Ausbleiben der Befruchtung zwischen den weiblichen Organen von M und den männlichen Organen von s keine echte Sterilität, sondern eine Incompatibilität, da aber die Ascogone von s von den Spermation von M befruchtet werden können, liegt in der Kreuzung $M \times s$ *Semi-Incompatibilität* vor (RIZET und ESSER 1953).

Das Auftreten von Barrage und Abweichungen von der normalen Compatibilität ist zwischen geographischen Rassen weit verbreitet. Es konnten von den verschiedensten Fundorten in Frankreich noch weitere 4 Stämme isoliert werden, die alle untereinander und mit S , s und M Barrage bildeten. Ferner wiesen sie die verschiedensten Compatibilitätsbeziehungen von totaler Compatibilität über Semi-Incompatibilität bis zu totaler Incompatibilität auf (RIZET und ESSER, unveröffentlicht).

Es erschien uns von Interesse zunächst die nichtreziproke Incompatibilität zwischen den selbstincompatiblen Stämmen M und s , die zusätzlich zur normalen bipolaren Incompatibilität auftritt, genetisch zu untersuchen. Diese Erscheinung ist im Hinblick auf die bisher bei Pilzen bekannten Incompatibilitätstypen neuartig.

II. Material und Methoden

Zu den vorliegenden Untersuchungen benutzten wir die selbstincompatiblen, homocaryotischen Stämme $+M$, $-M$, $+s$, $-s$ von *Podospira anserina* (CES.) REHM. Sie stammen aus den Kulturen von Herrn Dr. G. RIZET, Paris. Die Stämme sind aus Einzelsporen des in der „région de l'Aisne“ (Frankreich) gefundenen Stammes M und des in der Umgebung von Potigny (Calvados, Frankreich) gefundenen Stammes s herangezogen worden. Anstelle von *Podospira* sind in der Literatur auch die Synonyma: *Bombardia*, *Philocopa* und *Pleurage* gebräuchlich.

Bei der Präparation und Aussaat der Sporen, der Kultur der Myzelien und der Durchführung der Tests verwendeten wir die von RIZET und ENGELMANN (1949) ausführlich beschriebenen Methoden. Die Spermatizationen führten wir nach der Methode von MONNOR (1953) durch. Methodische Einzelheiten und vor allem die rechnerischen Manipulationen werden im Text an den entsprechenden Stellen kurz erläutert.

III. Genetische Analyse der Semi-Incompatibilität

M und s bilden bei Gegenüberstellungen eine Barrage und sind semi-incompatibel. Perithezien entstehen nur auf der Seite von s . Zwischen Stämmen der F_1 von $M \times s$ fanden wir in informatorischen Versuchen als Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen die in Tabelle 1 dargestellten Verhältnisse.

Die Semi-Incompatibilität (Nr. 1) ist die Relation, die schon zwischen den Eltern M und s besteht. Das Vorhandensein weiterer Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen (Nr. 2, 3, 4) läßt annehmen, daß die Eltern M und s für verschiedene Faktorenpaare heterogen sind. Die neuen Beziehungen müssen infolge von Rekombinationen entstanden sein. Während bei Barragebildung Compatibilität, Semi-Incompatibilität und Incompatibilität (trotz entgegengesetzter Kreuzungs-

Tabelle 1. Kontakt und Fertilitätsbeziehungen in der F_1 von $M \times s$ bei Kreuzung von einem $+$ -Stamm mit mehreren $-$ -Stämmen

Nr.	Kreuzung	Kontakt	Fertilität	Zeichen
1	$+11 \times -47$	Barrage	Semi-Inkompatibilität	$\vdots\vdots$
2	$+11 \times -96$	Barrage	Inkompatibilität	\parallel
3	$+11 \times -81$	Barrage	Compatibilität	$\vdots\vdots$
4	$+11 \times -43$	normaler Kontakt	Compatibilität	$\vdots\vdots$

In dieser und in den folgenden Tabellen werden Abkürzungen benutzt; es bedeutet: $\vdots\vdots$ Barrage, \parallel normaler Kontakt, $\vdots\vdots$ eine Linie von Perithezien.

typen) beobachtet wurde (Nr. 1, 2, 3), war der normale Kontakt (Nr. 4) immer mit Compatibilität verbunden, wie durch Spermatisierungen festgestellt wurde. Zur Analyse dieser Phänomene begannen wir innerhalb einer zahlreichen Nachkommenschaft der Kreuzung $M \times s$ nach homogenen Gruppen zu suchen.

1. Isolierung von Gruppen und Untergruppen aus der F_1 von $M \times s$

Aus der F_1 von $M \times s$ wurden 252 einkernige Sporen, meist Paare, isoliert und ausgesät. Es keimten davon 203 ($= 80,5\%$). Der normale Prozentsatz von gekeimten Sporen beträgt 95—100 (RIZET und ENGELMANN 1949). Der sehr niedrige Keimprozentatz dieser Versuche läßt vermuten, daß die Eltern Letalgene besitzen. Zumindest müssen aber Erbfaktoren vorhanden sein, die für eine verminderte Lebensfähigkeit von Myzelien verantwortlich sind; es kam nämlich hinzu, daß 40 Stämme nur ein sehr spärliches Wachstum aufwiesen. Sie konnten für die weiteren Versuche nicht berücksichtigt werden.

a) **Einordnung in Gruppen.** Wie schon RIZET (1953) feststellte, sind die Allelenpaare tt_1 , uu_1 , vv_1 für die Ausbildung der Barrage zwischen M und s verantwortlich. M trägt die Gene $t_1 u_1 v_1$; s besitzt deren Allele $t u v$. In der F_1 von $M \times s$ finden sich demnach neben den Parentalkombinationen 6 Rekombinationsgruppen, die wir g , h , i , j , k , l nennen und die folgende Genotypen besitzen:

$$\begin{array}{lcl}
 M = t_1 u_1 v_1 \\
 s = t u v \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} M \\ s \end{array}} \right\} \text{Parentaltypen} \\
 g = t u v_1 \\
 h = t_1 u v_1 \\
 i = t_1 u v \\
 j = t_1 u_1 v \\
 k = t u_1 v \\
 l = t u_1 v_1 \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} g \\ h \\ i \\ j \\ k \\ l \end{array}} \right\} \text{Rekombinationstypen}
 \end{array}$$

Eine Barrage bildet sich nicht nur, wenn sich 2 Stämme wie die Eltern durch 3 Genpaare unterscheiden, sondern schon bei einer monogenen Differenz. Demnach geben alle Stämme einer Gruppe Barrage mit jedem Stamm aller anderen Gruppen. Die Angehörigen einer Gruppe bilden aber nicht immer normalen Kontakt untereinander. Es sind Stämme vorhanden, die mit einem Teil ihrer Gruppe normalen Kontakt, mit den anderen Stämmen ihrer Gruppe sowie mit allen Stämmen der übrigen Gruppen die Barragereaktion geben. Dieser Befund ist nur durch die Annahme zu erklären, daß neben dem durch die Allelenpaare tt_1 , uu_1 , vv_1 bedingten Barragemechanismus noch ein weiterer vorhanden ist,

dessen genetische Grundlage noch unbekannt ist. Die Barragegruppen $M, s \dots l$ sind also heterogen.

Die 163 normal wachsenden Stämme aus der F_1 von $M \times s$ konnten mit Hilfe von Teststämmen in die 8 Barragegruppen eingeordnet werden (Tabelle 2). Dazu waren 1304 Kreuzungen notwendig. 15 Stämme (aus den Gruppen s, g, h, i, j, k) gaben Barragereaktion innerhalb der Gruppe. Damit ist eine Handhabe zur weiteren Unterteilung der Gruppen in Untergruppen gegeben.

Tabelle 2. Aufspaltung der F_1 von $M \times s$ in Barragegruppen

Gruppe	M	s	g	h	i	j	k	l
Genotyp	$t_1 u_1 v_1$	$t u v$	$t u v_1$	$t_1 u v_1$	$t_1 u v$	$t_1 u_1 v$	$t u_1 v$	$t u_1 v_1$
Anzahl der Stämme	15	30	20	18	26	9	34	11
Anzahl der Stämme mit Barragebildung innerhalb der Gruppe	—	2	1	6	3	2	1	.

Mit dem χ^2 -Test läßt sich eine 1:1-Spaltung nicht sichern ($P < 0,002$).

b) Unterteilung der Barragegruppen in Untergruppen. Wir begannen mit der Gruppe i . Die 26 i -Stämme wurden in den möglichen Kombinationen ($14 +$ -Stämme $\times 12$ —-Stämme = 168 Kreuzungen) auf ihre Kontakt- und Fruchtkörperbildung getestet. Sie konnten in die Untergruppen i_1, i_3 und i_4 unterteilt werden (Abb. 4).

$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	i_1	i_3	i_4
i_1			
i_3			
i_4			

Abb. 4. Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen innerhalb der Gruppe i

Die Untergruppen von i und den noch zu untersuchenden anderen Barragegruppen werden hier schon mit den endgültigen Zahlen benannt, die ihnen auf Grund der genetischen Analyse (s. nächstes Kapitel) gegeben wurden. Dabei ist auf die zur Zeit noch fehlenden Untergruppen, wie z. B. i_2 , Rücksicht genommen worden.

Die Stämme von i_1 bilden Barrage mit den i_3 -Stämmen, aber nicht mit den i_4 -Stämmen. Zwischen den Stämmen der Untergruppen 3 und 4 konnte stets normaler Kontakt beobachtet werden. Bei normalem Kontakt war Kompatibilität (Test durch Spermatisation) und bei Barragebildung Semi-Inkompatibilität (mit Perithezienbildung auf der Seite der i_1 -Stämme) vorhanden.

Die Gruppen s, g, h, j, k ließen sich durch entsprechende Versuche in gleicher Weise in je drei Untergruppen unterteilen. Da in den Gruppen M und l keine Stämme vorhanden sind, die miteinander Barrage bilden (s. Tab. 2), konnte eine Unterteilung dieser Gruppen nicht vorgenommen werden.

Nachdem die Unterteilung der Gruppen in Untergruppen durchgeführt war, entstand die Frage nach den Fertilitätsbeziehungen zwischen den Untergruppen verschiedener Gruppen. Die möglichen Kreuzungen zwischen den Stämmen der Gruppen h und i ($8 h +$ -Stämme $\times 12 i$ —-Stämme; $10 h$ —-Stämme $\times 14 h +$ -Stämme; also 236 Kreuzungen) erlaubten eine weitere Unterteilung der Gruppe h in insgesamt 6 Untergruppen. Die Einteilung der Gruppe i in 3 Untergruppen blieb dagegen unverändert. In der nächsten Versuchsreihe wurden alle Stämme

der Gruppen M, g, j, k, l, s mit je einem Stamm der 6 Untergruppen von h und der 3 Untergruppen von i gekreuzt (insgesamt 1011 Kreuzungen). Da in der Untergruppe h_1 nur ein $-$ -Stamm vorlag, konnten nur die $+$ -Stämme mit h_1 gekreuzt werden. Die Auswertung dieser Versuche führte zu einer nochmaligen Unterteilung einer Untergruppe, und zwar konnte innerhalb der Gruppe g von der Untergruppe g_1 die Untergruppe g_5 abgeteilt werden. Ferner ließen sich jetzt auch die Gruppen M und l in Untergruppen aufteilen. Untergruppen verschiedener Gruppen mit gleichem Kontakt- und Fertilitätsverhalten gegenüber den h - und i -Testern werden mit den gleichen Indices bezeichnet, z. B. s_1, g_1, j_1, k_1, l_1 . Die zahlenmäßige Verteilung der 163 Stämme aus der F_1 von $M \times s$ auf die Untergruppen zeigt Tabelle 3. Es fällt auf, daß die Untergruppen 5, 7 und 8 nur in den Gruppen M, g, h, l vorhanden sind, die das Gen v_1 tragen.

Die noch fehlenden Beziehungen zwischen den Untergruppen von M, g, j, k, l, s wurden ermittelt, indem wir von jeder Untergruppe einen Stamm mit einem Stamm von jeder anderen Untergruppe kreuzten, z. B. s_1 wurde mit $M_3, M_4, M_7, M_8, g_1, g_3, g_4, g_5, j_1, j_3, j_4, k_1, k_3, k_4, l_1, l_3$ gekreuzt (253 Kreuzungen). Im Verlauf dieser Kreuzungen fanden wir keine neuen Untergruppen, auch nicht die Untergruppen 5, 7 und 8 der Gruppen s, i, j, k .

Alle Stämme von jeder der nun vorhandenen Untergruppen verhalten sich gleich. Auf Grund dieser Homogenität kann man vermuten, daß die Untergruppen genetisch einheitlich sind. Ferner bestehen keinerlei Unterschiede, die durch den Kreuzungstyp bestimmt werden.

Tabelle 3. Unterteilung der Barragegruppen in Untergruppen, die hinsichtlich der Kontakt- und Fruchtkörperbildung homogen sind

Gruppe	Genotyp der Gruppe	Anzahl der Stämme je Gruppe	Anzahl der Stämme je Untergruppe					
			1	3	4	5	7	8
M	$t_1u_1v_1$	15	—	1	2	—	3	9
s	tuv	30	26	2	2	—	—	—
g	tuv_1	20	12	1	1	6	—	—
h	t_1uv_1	18	1	3	6	2	3	3
i	t_1uv	26	2	3	21	—	—	—
j	t_1u_1v	9	1	2	6	—	—	—
k	t_1u_1v	34	29	1	4	—	—	—
l	$t_1u_1v_1$	11	6	—	—	5	—	—

Da eine tabellarische Darstellung der Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen den bis jetzt bekannten 28 Untergruppen unübersichtlich ist, beschränken wir uns darauf, die sich ergebenden Regelmäßigkeiten anhand von Einzeldarstellungen zu erläutern. Trotz der in den einzelnen Gruppen fehlenden Untergruppen (z. B. in der Gruppe M fehlen M_1 und M_5), läßt sich wegen des gleichartigen Verhaltens entsprechender Untergruppen folgendes aussagen:

1. Kreuzungen der Untergruppen innerhalb einer Gruppe (Abb. 5) geben für alle 8 Gruppen die gleichen Beziehungen, die schon in Abb. 4 für die Gruppe i dargestellt wurden. Dabei können die Untergruppen 1, 3 und 4 den Untergruppen 5, 7 und 8 gleichgesetzt werden. Die Untergruppen 1 und 5 reagieren sowohl mit der Untergruppe 3 als auch mit 7 durch Barrage und Semi-Incompatibilität. Perithezien werden nur auf der Seite von 1 bzw. 5 gebildet.

2. Auch in Kreuzungen von Untergruppen der Gruppen *M*, *g*, *h*, *l*, die homogen für v_1 sind, zeigen die Untergruppen 5, 7 und 8 gleiches Verhalten wie 1, 3 und 4 (Abb. 6). Da es sich bei diesen Kreuzungen um Untergruppen verschiedener Barragegruppen handelt, wird in jedem Falle eine Barrage gebildet. Die Fertilitätsverhältnisse sind aber dieselben wie zwischen den Untergruppen innerhalb einer Gruppe (vgl. Abb. 6 mit Abb. 5: 1×3 , 1×7 , 5×3 , 5×7 sind semi-inkompatibel; alle anderen Verbindungen kompatibel).

3. Die Untergruppen 1, 3 und 4 der Gruppen *s*, *i*, *j*, *k*, die für v homogen sind (s. Tabelle 3), reagieren in den möglichen Kombinationen in gleicher Weise, wie es in Abb. 6 für die homogenen v_1 -Untergruppen angegeben ist. Die Verbindungen 1×3 sind semi-inkompatibel; alle anderen Kombinationen kompatibel.

$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	1 oder 5	3 oder 7	4 oder 8
1 oder 5			
3 oder 7			
4 oder 8			

Abb. 5

$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	1 oder 5	3 oder 7	4 oder 8
1 oder 5			
3 oder 7			
4 oder 8			

Abb. 6

$\begin{smallmatrix} v_1 + \\ v - \end{smallmatrix}$	5	7	8
1			
3			
4			

Abb. 7

Abb. 5. Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen der möglichen Kreuzungen der Untergruppen innerhalb einer Gruppe

Abb. 6. Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen der möglichen Kreuzungen zwischen Untergruppen, die entweder für v_1 oder für v homogen sind

Abb. 7. Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen der möglichen Kreuzungen zwischen den Untergruppen 1, 3, 4 der v -Gruppen und den Untergruppen 5, 7, 8 der v_1 -Untergruppen

4. Die Fertilitätsbeziehungen entsprechender Untergruppen zueinander sind demnach völlig gleich, wenn die Partner einer Kreuzung entweder für v oder für v_1 homogen sind. Nur in Kreuzungen zwischen v - und v_1 -Untergruppen lassen sich die Untergruppen 5, 7 und 8 von den Untergruppen 1, 3 und 4 differenzieren. Während 1, 3 und 4 ohne Rücksicht auf v oder v_1 miteinander reagieren, wie in Abb. 6 dargestellt ist, verhalten sich die Kombinationen der 1, 3, und 4 v -Untergruppen mit den 5, 7 und 8 v_1 -Untergruppen nach folgendem Schema (Abb. 7): Mit Ausnahme der Verbindung 3×5 , die völlig inkompatibel ist, sind alle Kombinationen semi-inkompatibel. Vergleicht man das Reaktionsschema aller Untergruppen verschiedener Gruppen, die für v oder v_1 homogen sind (Abb. 6), mit Abb. 7, so erkennt man, daß der einzige Unterschied im völligen Fehlen der Perithezienbildung auf der Seite der v_1 -Untergruppen 5, 7 und 8 besteht. Man kann annehmen, daß das Allelenpaar v/v_1 nicht nur für die Barragebildung zwischen den einzelnen Gruppen verantwortlich ist, sondern außerdem noch einen Einfluß auf die Fertilitätsrelationen zwischen den Untergruppen hat.

5. Das Fehlen von Barragebildung innerhalb der Gruppen *M* und *l* (s. S. 602) läßt sich jetzt erklären. Wir wissen, daß innerhalb einer Gruppe die Untergruppen 1 und 5 mit den Untergruppen 3 und 7 statt eines normalen Kontaktes Barrage bilden. In der Gruppe *M* sind die Untergruppen 1 und 5 und in *l* die Untergruppen 3 und 7 nicht aufgefunden worden.

6. Das Allelenpaar t/t_1 scheint für die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Untergruppen innerhalb der Gruppen verantwortlich zu sein. Alle Gruppen, die das Gen t besitzen (s, g, k, l), enthalten in Überzahl oder ausschließlich (s. Tabelle 3) die Untergruppen 1 und 5. Hingegen sind in den Gruppen M, h, i, j , die das Gen t_1 tragen, die Untergruppen 3, 4, 7 und 8 stärker vertreten. Man kann vermuten, daß Koppelungsbeziehungen zwischen den Barragegenen t/t_1 und einem (oder mehreren) der für die Inkompatibilität verantwortlichen Faktoren, die die Untergruppeneinteilung bestimmen, bestehen.

Mit der Unterteilung der F_1 von $M \times s$ in homogene Untergruppen und der Auffindung von Regelmäßigkeiten im Kontakt- und Fertilitätsverhalten der Untergruppen zueinander ist die Grundlage für die Ascusanalyse gegeben. Mit ihrer Hilfe soll die genetische Basis für die Einteilung in Untergruppen gefunden werden. Da maximal 6 Untergruppen in einer Gruppe vorhanden sind, müssen mindestens 3 Genpaare für die Unterteilung der Barragegruppen in Untergruppen verantwortlich sein. Allerdings wären unter dieser Voraussetzung 8 Untergruppen je Gruppe zu erwarten. Das Fehlen von Untergruppen in allen Gruppen (vor allem aber auch das Fehlen der Untergruppen 5, 7, 8 in den v -Gruppen s, i, j, k), ist wahrscheinlich durch Letalwirkungen dieser 3 Genpaare bedingt. Auf die verminderte Keimfähigkeit von Sporen und die herabgesetzte Lebensfähigkeit von Myzelien wurde schon einleitend hingewiesen. Durch solche Letalitätseffekte könnte der Ausfall von Untergruppen zustande kommen.

Die Eltern M und s konnten auf Grund von Testen mit den h - und i -Untergruppen in die Untergruppen M_7 bzw. s_1 eingeordnet werden. Diese beiden Untergruppen müssen also die größte genetische Differenz besitzen.

Die genetische Analyse der Untergruppen soll dazu dienen, die genetischen Bedingungen der Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen den einzelnen Untergruppen und die genetische Verschiedenheit der Eltern M und s zu erfassen, die Ursachen für das Fehlen von Untergruppen in allen Gruppen und die Ursachen für das Fehlen einer 1:1-Aufspaltung der F_1 von $M \times s$ hinsichtlich der Gruppen und Untergruppen aufzufinden.

2. Genetische Analyse der Untergruppen der F_1 aus der Kreuzung $M \times s$

Die genetische Analyse der Untergruppen begannen wir mit den Gruppen s (tuv) und g (tuv_1). Das Faktorenpaar t/t_1 ist, wie oben erläutert wurde, anscheinend für die ungleichmäßige Verteilung der einzelnen Stämme auf die Untergruppen innerhalb der einzelnen Gruppen verantwortlich. Durch die Homogenität der Gruppen g und s für t sind diese Wirkungen von t/t_1 , die bei der genetischen Analyse stören, ausgeschaltet. g und s sind dagegen heterogen für das Allelenpaar v/v_1 , das die Fertilitätsbeziehungen zwischen den Untergruppen und insbesondere die totale Inkompatibilität bestimmt.

a) Genetische Analyse der Gruppe s . Ausgehend von den Experimenten, die zur Unterteilung der F_1 von $M \times s$ in Untergruppen führten, nahmen wir an, daß alle Stämme einer Untergruppe hinsichtlich der Kontakt- und Fertilitätsrelationen, mit Ausnahme des Kreuzungstyps, *homogen* sind (s. S. 603). Zur Prüfung dieser Annahme wurden innerhalb der Untergruppen s_1, s_3, s_4 je 2 $+$ -Stämme mit je 2 $-$ -Stämmen gekreuzt und aus jeder Kreuzung 10 Asc isoliert, die ein

Tabelle 4. Die Ergebnisse von Kreuzungen zwischen Untergruppen aus der F_1 von $M \times s$

Nr.	Kreuzung	Anzahl der Asci	Aussaat der Sporen				Anzahl der gekeimten Sporen				Test mit	Zusammensetzung der F_1			χ^2 -Test		
			Paare	Doppelpaare	Einzelsporen	insgesamt	Paare	Doppelpaare	Einzelsporen	insgesamt		Typ	Anzahl	Werte für den χ^2 -Test	χ^2	N	P
1	$s_4 \times s_3$	32	29	2	1	67	56	8	1	65	s_1	s_4	30	15	0,125	1	0,8—0,7
2	$s_1 \times s_4$	25	25	—	—	50	47	—	—	47	s_3	s_3	35	17			
3	$s_1 \times s_3$	111	102	9	—	240	198	34	—	232	s_4	s_1	19	11	0,360	1	0,7—0,5
4	$g_1 \times g_3$	131	128	3	—	268	244	12	—	256	s_4	s_4	28	14			
5	$g_1 \times g_4$	79	74	5	—	168	134	20	—	154	s_1	s_1	52	24	0,748	3	0,9—0,8
6	$g_3 \times g_4$	26	25	1	—	54	46	4	—	50	s_3	s_3	62	28			
7	$s_1 \times g_1$	27	25	2	—	58	48	7	—	55	s_4	s_4	59	30			
8	$g_1 \times g_5$	50	40	1	9	93	78	3	3	84	s_2	s_2	59	29			
9	$g_5 \times g_8$	19	18	1	—	40	35	4	—	39	g_1	g_1	80	37	2,046	3	0,7—0,5
10	$g_8 \times g_7$	19	15	4	—	46	29	16	—	45	g_3	g_3	72	35			
11	$g_5 \times g_7$	30	26	4	—	68	44	15	—	59	g_4	g_4	56	30			
12	$g_3 \times g_7$	29	24	5	—	68	46	19	—	65	s_1	g_2	48	27			
13	$g_4 \times g_8$	20	18	2	—	44	35	8	—	43	s_3	g_1	71	37	0,206	1	0,7—0,5
14	$s_1 \times g_5$	41	35	6	—	94	67	23	—	90	g_4	g_4	83	41			
15	$s_3 \times g_7$	32	27	5	—	74	50	20	—	70	g_3	g_3	26	14	0,154	1	0,8—0,7
16	$s_4 \times g_8$	44	39	5	—	98	72	20	—	92	g_4	g_4	24	12			
											g_1	g_1	28	15	0,333	1	0,7—0,5
											g_5	g_5	27	12			
											g_8	g_8	27	12			
											g_5	g_5	53	22	0,510	1	0,5—0,3
											g_8	g_8	41	27			
											g_5	g_5	23	10	0,052	1	0,9—0,8
											g_8	g_8	16	9			
											g_7	g_7	21	8	0,474	1	0,5—0,3
											g_8	g_8	24	11			
											g_5	g_5	20	9			
											g_7	g_7	12	5	1,205	3	0,8—0,7
											g_8	g_8	14	8			
											g_6	g_6	13	7			
											g_3	g_3	30	16	0,310	1	0,7—0,5
											g_7	g_7	35	13			
											g_4	g_4	23	12	0,800	1	0,5—0,3
											g_8	g_8	20	8			
											s_1	s_1	23	10			
											s_5	s_5	20	6	2,805	3	0,5—0,3
											g_5	g_5	23	12			
											g_1	g_1	24	13			
											s_3	s_3	17	6			
											s_7	s_7	12	7	1,250	3	0,8—0,7
											g_3	g_3	22	9			
											g_7	g_7	19	10			
											s_4	s_4	24	9			
											s_8	s_8	16	10	1,272	3	0,8—0,7
											g_4	g_4	28	11			
											g_8	g_8	24	14			

Einzelsporenpaar und 3 Doppelsporen enthielten. Sowohl die aus den einkernigen Sporen hervorgegangenen selbststerilen Myzelien, als auch die Nachkommenschaften der aus Doppelsporen entstandenen selbstfertilen Stämme, waren in Beziehung auf die Kontaktbildung und Fertilität mit den Eltern identisch. Auf Grund dieses Homogenitätstestes ergibt sich, daß die Stämme innerhalb der Untergruppen s_1 , s_3 und s_4 genetisch einheitlich sind.

Zur Ermittlung der genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen führten wir die Kreuzungen der Untergruppen s_1 , s_3 , s_4 in den möglichen Kombinationen durch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Anhand der ersten Kreuzung ($s_4 \times s_3$) wird die Methode ausführlich erläutert. Die folgenden Kreuzungen und ihre Auswertung erfolgten in der gleichen Weise. Jede Kreuzung wiederholten wir in der für den Kreuzungstyp reziproken Kombination, z. B. zu $+s_4 \times -s_3$ als Wiederholung $-s_4 \times +s_3$.

Aus der Kreuzung $s_4 \times s_3$ isolierten wir 32 gemischtsporige Asci und säten aus diesen 29 Einzelsporenpaare, 2 Doppelpaare von Einzelsporen und aus einem Ascus eine Einzelspore aus. Die Einzelsporenpaare, die Halbtetraden darstellen, wurden hauptsächlich deswegen isoliert, weil nur mit ihrer Hilfe die Koppelungsbeziehungen errechnet werden können (s. Kapitel III, 3). Von den 67 Einzelsporen keimte aus 2 Paaren je eine Spore nicht. Die erhaltenen 65 Myzelien wurden mit $+s_1$, $+s_3$, $+s_4$, $-s_1$, $-s_3$, $-s_4$ -Stämmen auf Kontaktbildung und Fertilität getestet. 30 Stämme verhielten sich wie s_4 und 35 wie s_3 . Dies läßt auf eine 1:1-Spaltung von $s_4:s_3$ schließen. Eine statistische Sicherung dieser Aufspaltung ist aber ohne vorherige Umrechnung dieser Werte nicht möglich. Da fast ausschließlich Paare von Einzelsporen isoliert wurden, sind die Werte 30 und 35 keine Zufallswerte sondern Korrelationswerte, die durch die Postreduktionsfrequenz der sie betreffenden Gene festgelegt sind. Diese Korrelationswerte müssen in Zufallswerte umgewandelt werden, damit die Aufspaltung mit dem χ^2 -Test geprüft werden kann. Um Zufallswerte zu erhalten, kann man die präreduzierten Paare (s_3/s_3 ; s_4/s_4) und Doppelpaare (z. B. $s_3/s_3/s_3/s_3$) nur als Einheit rechnen. Von den postreduzierten Paaren (s_3/s_4) und Doppelpaaren ($s_3/s_4/s_3/s_4$) werteten wir nur eine Spore, und zwar stets die im Ascus zu unterst liegende. Einzelne einkernige Sporen, die entweder aus Asci mit einer dreikernigen- und zwei zweikernigen Sporen stammen oder von Paaren übrigbleiben, von denen eine Spore nicht keimt, können als Einheit gezählt werden. Unter Anwendung dieser Überlegungen erhält man aus der F_1 von $s_4 \times s_3$ folgende Werte für den χ^2 -Test:

s_4 : 11 präreduzierte Paare oder Doppelpaare	}	zusammen 15
3 postreduzierte Paare oder Doppelpaare		
1 Einzelspore		
s_3 : 23 präreduzierte Paare oder Doppelpaare	}	zusammen 17
2 postreduzierte Paare oder Doppelpaare		
1 Einzelspore		

Die Werte 15 und 17 geben bei Voraussetzung einer 1:1-Spaltung ein $\chi^2 = 0,125$ und bei einem Freiheitsgrad $N = 1$ einen P -Wert = 0,8—0,7.

Trotzdem die Kreuzungen der Tabelle 4 durch den χ^2 -Test in ihrer Aufspaltung gesichert sind, führten wir noch zusätzlich (mit Ausnahme der Kreuzungen Nr. 12 und 13) die Tetradenanalyse der Asci durch. Dazu eignen sich besonders die gemischtsporigen Asci, die in jeder Hälfte ein Paar von Einzelsporen enthalten. Solche 6-sporigen Asci mit der Konstitution: Doppelspore, Einzelsporenpaar, Doppelspore, Einzelsporenpaar wurden vereinzelt gefunden. Da jedes Einzelsporenpaar die genetische Konstitution eines Halbascus wiedergibt (s. Abb. 1), ist durch den Test von 2 Einzelsporenpaaren aus verschiedenen Ascushälften der Genotyp des ganzen Ascus zu ermitteln. In den anderen Fällen, wenn in einer Kreuzung nur Asci mit Einzelsporen in einer Ascushälfte gefunden wurden, und somit nur der Genotyp dieser Hälfte festzustellen war, wurde aus der anderen Hälfte eine Doppelspore entnommen. Da die Doppelsporen auf Grund der hohen Postreduktionsfrequenz von $+/-$ fast ausschließlich selbstfertile Myzelien hervorbringen, konnte durch Untersuchung der Nachkommenschaft einer $+/-$ -Doppelspore deren Genotyp und damit die Konstitution der anderen Ascushälfte

bestimmt werden. In jedem Falle konnte durch die Tetradenanalyse die mit Hilfe von Zufallswerten gefundene Aufspaltung bestätigt werden.

s_4 und s_3 differieren in einem Genpaar, das wir a/a_1 nennen. Wir ordnen a s_4 zu; s_3 besitzt demzufolge a_1 . s_4 unterscheidet sich von s_1 ebenfalls durch nur ein Gen (Kreuzung Nr. 2, Tabelle 4). Dies kann aber nicht der Faktor a sein, denn dann wären s_1 und s_3 identisch. Eine Identität muß auf Grund des verschiedenen Kontakt- und Fertilitätsverhaltens der beiden Stämme ausgeschlossen werden. Als verantwortlich für die genetische Differenz s_1/s_4 nehmen

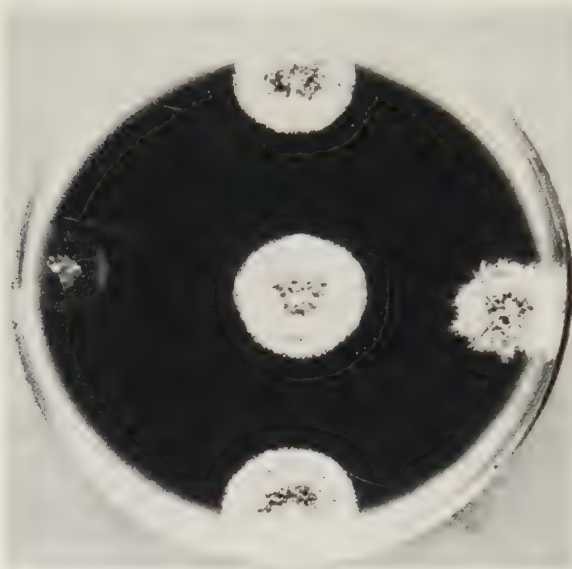


Abb. 8. Myzelien von *Podospora* 2 Tage nach der Sporenaussaat: Normale Myzelien (oben, Mitte unten). Myzelium mit verminderter Lebensfähigkeit (links). Heterokaryon normal-vermindert lebensfähig (rechts)

wir daher das Allelenpaar b/b_1 an und ordnen s_1 das Gen b und s_3 , dessen Allel b_1 zu. Da s_1 und s_4 für b/b_1 heterogen sind und sich gleichzeitig in nur einem Gen als verschieden erweisen, müssen sie am a -Locus homogen sein. Nach der gleichen Überlegung müssen s_3 und s_4 die gleichen b -Gene besitzen. s_1 und s_3 sind daher sowohl für den a -Faktor als auch für den b -Faktor heterogen. Die Untergruppen von s besitzen demnach die folgenden genetischen Formeln:

$$s_4 = a b_1; s_3 = a_1 b_1;$$

$$s_1 = a b.$$

Auf Grund dieser Befunde mußte man erwarten, daß in der F_1 von $s_1 \times s_3$ neben

den beiden Eltern die beiden Rekombinationstypen zu finden seien, von denen der eine mit $a b_1$ ($= s_4$) und der andere mit $a_1 b$ ($=$ eine bisher noch nicht aufgefundene Untergruppe) zu bezeichnen wäre. Die Ergebnisse der Kreuzung $s_1 \times s_3$ (Tabelle 4, Nr. 3) bestätigten dies. Von den 232 Myzelien der F_1 ließen sich 173 (etwa 75%) in die Untergruppen s_1 , s_3 , s_4 einordnen. Die restlichen 59 Myzelien besaßen eine verminderte Lebensfähigkeit, wie sie schon bei Stämmen aus der F_1 von $M \times s$ beobachtet wurde (s. S. 601).

Während die normal wachsenden Myzelien der Untergruppen s_1 , s_3 , s_4 in 24 Std 6–8 mm wachsen und ein reichliches Lufthyphengeflecht besitzen, bilden die Stämme mit verminderter Vitalität nur ein spärliches Myzel, das nur 3–4 mm in 24 Std. wächst (Abb. 8). Ein Test dieser 59 Stämme, die wir in der Untergruppe s_2 zusammenfassen, ist nicht möglich. Ihr genetisches Verhalten, über das bereits kurz berichtet wurde (ESSER 1955), soll im zweiten Teil ausführlich geschildert werden.

Wenn sich auch die Stämme s_2 nicht testen lassen, so ist es doch möglich, ihren Genotyp mit Hilfe der Tetradenanalyse eindeutig als $a_1 b$ zu ermitteln.

Eine Rückkreuzung der Untergruppe s_1 mit dem Elter s zeigte, daß die beiden identisch sind. Ihr übereinstimmendes Kontakt- und Fertilitätsverhalten ließ dies bereits vermuten (s. S. 605).

Die Kreuzungen der Untergruppen von s ergaben: Die Gruppe s besteht aus 4 Untergruppen, die durch das Vorliegen von 2 Allelenpaaren (a/a_1 , b/b_1) bestimmt werden. Eine Untergruppe (s_2) besitzt verminderte Lebensfähigkeit. Wir erhielten jedoch keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein eines dritten Allelenpaares, das auf Grund der Einteilung der Gruppen (s. S. 605) erwartet werden konnte.

b) Genetische Analyse der Gruppe g . Bei der genetischen Analyse der Untergruppen von Gruppe g verfahren wir ähnlich wie bei der Analyse der Gruppe s . Der Homogenitätstest ergab, daß sowohl die Stämme von g_1 als auch die von g_5 genetisch einheitlich sind. Von den Untergruppen g_3 und g_4 stand nur je 1 Stamm zur Verfügung, so daß ein Test auf Homogenität nicht möglich war.

Man kann annehmen, daß zwischen den Untergruppen g_1 , g_3 und g_4 die gleichen genetischen Differenzen bestehen wie zwischen entsprechenden Untergruppen der Gruppe s , denn g_1 und s_1 , bzw. g_3 und s_3 , bzw. g_4 und s_4 stimmen in ihrem Kontakt- und Fertilitätsverhalten innerhalb ihrer Gruppe (s. Abb. 5) überein. Die möglichen Kreuzungen zwischen g_1 , g_3 und g_4 (Tabelle 4, Nr. 4—6) bestätigten diese Annahme. g_4 unterscheidet sich von g_3 und g_1 durch je 1 Gen, g_1 von g_3 durch 2 Faktoren. Ferner war in der F_1 von $g_1 \times g_3$ bei 25% der Stämme eine verminderte Vitalität vorhanden. Ihr Test war nicht möglich. Sie wurden in Untergruppe g_2 zusammengefaßt. Die Zuordnung der Inkompatibilitätsfaktoren a/a_1 , b/b_1 zu den g -Untergruppen läßt sich durch die Ergebnisse der Kreuzung g_1 ($tuv_1a \ ? \ b \ ?$) \times s_1 ($tuvab$) (Tabelle 4, Nr. 7) ermöglichen. g_1 und s_1 unterscheiden sich nur durch ein Gen, wie die 1:1-Aufspaltung in der F_1 beweist. Da diese monogene Differenz aber schon durch v/v_1 gegeben ist, muß g_1 die gleichen Inkompatibilitätsgene besitzen wie s_1 , nämlich a und b . Unter Berücksichtigung der Kreuzungsergebnisse Nr. 4, 5, 6 aus Tabelle 4 kann dann g_3 der Genotyp $tuv_1a_1b_1$ und g_4 der Genotyp tuv_1ab_1 zugesprochen werden. Die Formel für die neu gefundene, wenig vitale Untergruppe g_2 muß lauten: tuv_1a_1b . Sie konnte durch die Aseusanalyse bestätigt werden. Durch die Kombination a_1b ist also unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, die in diesem Fall durch die Differenz v/v_1 gegeben ist, die Lebensfähigkeit eines Myzeliums herabgesetzt.

Nachdem die genetischen Verhältnisse innerhalb der Untergruppen g_{1-4} geklärt sind, soll versucht werden, die Unterschiede zwischen g_{1-4} einerseits und g_5 andererseits zu finden. Durch Test der Nachkommenschaft von $g_1 \times g_5$ (Tabelle 4, Nr. 8) konnte eine 1:1-Spaltung von $g_1:g_5$ nachgewiesen werden. Die beiden Untergruppen unterscheiden sich durch ein Faktorenpaar, das wir c/c_1 nennen. g_1 trägt c , g_5 besitzt c_1 . Die vollständige Formel der beiden Untergruppen lautet dann: $g_1 = tuv_1abc$, $g_5 = tuv_1abc_1$. Da aber g_3 ($=tuv_1a_1b_1c$?) sich von g_1 durch das Faktorenpaar a_1b_1 unterscheidet, folgt, daß g_3 das Gen c besitzt. g_3 und g_5 würden danach an 3 Loci heterogen sein. Bei einer Kreuzung dieser Stämme müßte die F_1 neben den Elterntypen noch 6 Neukombinationstypen der Allelenpaare a/a_1 , b/b_1 , c/c_1 hervorbringen.

Aus 11 gemischtsporigen Asci der Kreuzung $g_3 \times g_5$ säten wir insgesamt 24 Sporen aus, die alle keimten. 4 Myzelien besaßen ein vermindertes Wachstum, das für die Untergruppen s_2 und g_2 charakteristisch ist. Sie konnten nicht getestet werden. Die übrigen 20 Stämme reagierten mit den Testern (Abb. 9). Abb. 9 zeigt, daß 10 Stämme in die bekannten Untergruppen g_1 , g_3 , g_4 , g_5 eingeordnet werden können. Je 5 Stämme fassen wir in Untergruppe 7 bzw. 8 zusammen, denn ihr Verhalten besitzt die Merkmale, die eine Aufstellung der Untergruppen 7 und 8 ermöglichte (vgl. Abb. 9 mit Abb. 6 und 7).

In der Nachkommenschaft der Kreuzung $g_3 \times g_5$ wurden also als Rekombinationen die Stämme der Untergruppen g_1, g_2, g_4, g_7, g_8 und Stämme mit verringerter Vitalität gefunden. Sie entsprechen 5 Neukombinationen. Da die Stämme mit verminderter Lebensfähigkeit nicht getestet werden können, besteht die Möglichkeit, daß diese nicht alle den gleichen Genotyp besitzen. Sie könnten sowohl die Untergruppe g_2 als auch die Untergruppe g_6 darstellen. Dann hätte die Kreuzung $g_3 \times g_5$ die zu erwartenden 6 Neukombinationen geliefert.

Anzahl der Stämme	Test mit:							zugehörige Untergruppe
	g_1	g_2	g_4	g_5	s_1	s_3	s_4	
1								g_1
2								g_3
6								g_6
1								g_5
5								g_7
5								g_8

Abb. 9. Test von 20 Stämmen aus der F_1 von $g_3 \times g_5$ auf Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zu verschiedenen Untergruppen. Auf Grund des Testes konnten die Stämme in bekannte Untergruppen eingeordnet werden (letzte Spalte)

Zwischen g_5 und den Untergruppen g_7 und g_8 bestehen die gleichen genetischen Zusammenhänge hinsichtlich der Incompatibilitätsgene a/a_1 und b/b_1 wie zwischen g_1, g_3 und g_4 . g_5 unterscheidet sich von g_7 durch 2 Faktoren (Tabelle 4, Nr. 11) und von g_8 durch ein Gen (Tabelle 4, Nr. 9). g_8 und g_7 besitzen eine monogene Differenz (Tabelle 4, Nr. 10). In der Nachkommenschaft von $g_5 \times g_7$ (Tabelle 4, Nr. 11) hatten 25% der Stämme vermindertes Wachstum. Sie können als g_6 bezeichnet werden. g_2 ist auszuschließen, da dieses nur in der F_1 von $g_1 \times g_3$ auftritt. Damit ist die Existenz von g_6 , die durch die Ergebnisse der Kreuzung $g_3 \times g_5$ wahrscheinlich geworden war, erwiesen.

Ausgehend von g_5 , dessen Genotyp als tuv_1abc_1 bestimmt wurde (s. S. 609 oben), gelten folgende Formeln:

$$g_7 = tuv_1a_1b_1c?$$

$$g_8 = tuv_1a_1b_1c?$$

$$\text{und demnach: } g_6 = tuv_1a_1b_1c?$$

Für die Zuordnung der Gene des Allelenpaares c/c_1 zu g_3, g_4, g_7 und g_8 liefern die Kreuzungen $g_4 \times g_8$ (Tabelle 4, Nr. 13) und $g_3 \times g_7$ (Tabelle 4, Nr. 12) gesicherte Daten. g_4 und g_8 sind homogen für tuv_1ab_1 . Ihre Nachkommenschaft zeigt eine 1:1-Spaltung von $g_4:g_8$. Sie unterscheiden sich also durch nur einen Faktor.

g_4 differiert von g_1 nur durch das Gen b_1 (Tabelle 4, Nr. 5). Da in allen Testen immer s_1 und s_3 benutzt wurden, hätte eine Differenz der Stämme g_1 und g_4 am c -Locus entdeckt werden müssen. Dies war nicht der Fall, und da g_1 das Gen c trägt, besitzt g_4 ebenfalls c .

Daraus folgt, g_8 hat am c -Locus die Konstitution c_1 . Auf Grund entsprechender Überlegungen kann g_3 der Genotyp $tuv_1a_1b_1c$ und g_7 die Formel $tuv_1a_1b_1c_1$ zugesprochen werden.

Damit ist die *genetische Beschaffenheit der 8 Untergruppen von Gruppe g* geklärt. Zu den Faktorenpaaren a/a_1 und b/b_1 , die im Verlauf der Analyse der Gruppe s gefunden wurden, wurde noch ein 3. Allelenpaar (c/c_1) entdeckt. Die Konstitution der Gene c/c_1 ist für die Untergruppen von s noch zu finden.

e) *Analyse der c-Gene der Gruppe s.* Wir begannen die Untersuchungen mit der Kreuzung eines s -Stammes und eines g -Stammes, die nur eine geringe genetische Differenz besitzen: $g_5(tur_1abc_1)$ und $s_1(turabc?)$ sind auf Grund ihrer verschiedenen Gruppenzugehörigkeit für v/r_1 heterogen. g_5 besitzt c_1 , die Konstitution des c -Locus von s_1 ist unbekannt. Da die beiden Stämme in allen anderen Faktoren homogen sind, kann in ihrer Nachkommenschaft höchstens mit einer Aufspaltung in 4 Untergruppen gerechnet werden. Die Kreuzung (Tabelle 4, Nr. 14) ergab tatsächlich diese Zahl. Die F_1 besteht zu gleichen Teilen aus den Stämmen s_1 , g_1 , g_5 und einer 4. Untergruppe, die Myzelien mit verminderter Lebensfähigkeit enthält entsprechend den Stämmen s_2 , g_2 , g_6 . Der Elter s_1 muß das Gen c besitzen, da der Genotyp $tur_1abc = g_1$ als Neukombination gefunden wurde und der Elter g_5 jedoch c_1 trägt. Die Stämme mit reduzierter Vitalität stellen demnach den anderen Rekombinationstyp $tuvabc_1$ dar und werden als s_5 bezeichnet. Diese Kreuzungsbefunde wurden durch die Tetradenanalyse bestätigt.

Die Kreuzungen $s_3(tura_1b_1c?) \times g_7(tur_1a_1b_1c_1)$ und $s_4(tuvab_1c?) \times g_8(tur_1ab_1c_1)$ (Tabelle 4, Nr. 15, 16), die ebenfalls nur für v/r_1 heterogen sind, und in denen das c -Gen von s_3 und s_4 unbekannt ist, gaben entsprechende Ergebnisse, wie die oben beschriebene Kreuzung $s_1 \times g_5$. In beiden Fällen erhielten wir in der F_1 eine Aufspaltung in 4 Untergruppen (2 Elterntypen und 2 Rekombinationstypen). Da als Neukombination im ersten Fall $g_3(tur_1a_1b_1c)$ und im zweiten Fall $g_4(tur_1ab_1c)$ gefunden wurden, müssen die Eltern s_3 bzw. s_4 das Gen c besitzen. In den Nachkommenschaften beider Kreuzungen besaß der andere Rekombinationstyp vermindertes Wachstum: er wurde als s_7 bzw. s_8 bezeichnet. Der Genotyp von s_7 und s_8 konnte ebenfalls aus der Tetradenanalyse berechnet werden. Für die Untergruppen von g und s gelten auf Grund der letzten Ergebnisse folgende Formeln:

$$\begin{array}{ll}
 s_1 = tuvabc & g_1 = tuv_1abc \\
 \times s_2 = tuv_a_1b_1c & \times g_2 = tuv_1a_1b_1c \\
 s_3 = tuv_a_1b_1c & g_3 = tuv_1a_1b_1c \\
 s_4 = tuv_a_1b_1c & g_4 = tuv_1a_1b_1c \\
 \times s_5 = tuv_a_1b_1c_1 & g_5 = tuv_1a_1b_1c_1 \\
 \times s_6 = tuv_a_1b_1c_1 & \times g_6 = tuv_1a_1b_1c_1 \\
 \times s_7 = tuv_a_1b_1c_1 & g_7 = tuv_1a_1b_1c_1 \\
 \times s_8 = tuv_a_1b_1c_1 & g_8 = tuv_1a_1b_1c_1
 \end{array}$$

Während in Gruppe g alle 8 Untergruppen aufgefunden wurden, konnte in Gruppe s die Untergruppe s_6 in den durchgeführten Kreuzungen nicht bestimmt werden.

s_6 kann nur in der Nachkommenschaft der Kreuzung $s_1 \times g_7$ zusammen mit allen anderen 6 schlecht wachsenden s - und g -Stämmen (\times) entstehen. Daher kann s_6 nicht identifiziert werden. Die Untergruppen mit reduzierter Vitalität (\times) besitzen entweder die Genkombination a_1b (g_2 , g_6 , s_2 , s_6) oder c_1v (s_5 , s_6 , s_7 , s_8). Die s_6 -Stämme tragen als einzige sowohl a_1b als auch c_1v . Sie sind in ihrer Lebensfähigkeit durch eine Überlagerung beider Mechanismen gehemmt.

Zusammenfassend läßt sich über die genetische Analyse der Gruppen g und s sagen: Jede Gruppe enthält 8 Untergruppen, die durch die gleichen 3 Erbfaktoren bestimmt werden. Von den insgesamt 16 Untergruppen der beiden Gruppen sind nur 9 analysierbar. Mit ihrer Hilfe konnten die restlichen 7 Untergruppen, die auf Grund spezifischer Kombinationen zwischen den Genpaaren v/v_1 , a/a_1 , b/b_1 , c/c_1 eine reduzierte Vitalität besitzen, ermittelt werden.

d) Die genetische Konstitution der Untergruppen der Gruppen h, i, j, k, l, M . Die Untergruppen der Gruppen h, i, j, k, l und M unterscheiden sich von den entsprechenden Untergruppen von g und s nur durch die Gene $t u v$ (s. S. 601). Man kann aus folgenden Gründen annehmen, daß sie die gleiche Kombination der Gene a, b und c tragen wie die entsprechenden g - und s -Untergruppen.

1. In keiner Gruppe wurden mehr als 8 Untergruppen gefunden, so daß außer den Incompatibilitätsallelenpaaren a/a_1 , b/b_1 , c/c_1 keine weiteren Erbfaktoren mehr vorhanden sein können.

2. Untergruppen mit dem Gen v zeigen (ohne Rücksicht auf ihre Gruppenzugehörigkeit) gleiches Kontakt- und Fertilitätsverhalten wie die s -Untergruppen mit dem gleichen Index. Untergruppen mit dem Gen v_1 stimmen in ihrem Verhalten mit den entsprechenden Untergruppen von g überein.

Diese Überlegungen wurden durch Kreuzungen zwischen Untergruppen von g und s (mit bekanntem Genotyp) mit Untergruppen der Gruppen h, i, j, k, l, M (mit unbekanntem Genotyp) bestätigt. Im Verlauf dieser Kreuzungen, die hier im einzelnen nicht besprochen werden sollen, konnten alle noch fehlenden Untergruppen aufgefunden und alle unbekannten Genotypen bestimmt werden. Für den Elter M wurde der Genotyp $t_1 u_1 v_1 a_1 b_1 c_1$ ermittelt.

Im Verlauf der genetischen Analyse konnte festgestellt werden, daß die Stämme M und s sich zusätzlich zu den Genen $t u v$ und $+$ noch durch weitere Gene, nämlich $a b c$, unterscheiden. Aus den bisher durchgeführten Kreuzungen kann auch entnommen werden, in welcher Weise diese 7 Gene die Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen M und s und zwischen den verschiedenen Rekombinationstypen (aus der F_1 von $M \times s$) bestimmen. Vor der Besprechung dieser Genwirkungen erscheint es uns aber zur besseren Charakterisierung der Gene $t u v a b c +$ noch wichtig, deren Koppelungsbeziehungen zu berechnen.

3. Ermittlung der Koppelungsbeziehungen zwischen den Genen $t, u, v, a, b, c, +$

Zur Analyse der Koppelungsbeziehungen ist es notwendig, für jedes Genpaar die Post- oder Präreduktionsfrequenz festzustellen. Bei *Podospora* läßt sich die Art der Reduktion eines Genpaares in einem Ascus aus der Konstitution eines Einzelsporenpaares entnehmen (s. S. 598 und Abb. 1, 2). Für jedes Faktorenpaar gibt es hinsichtlich der Reduktion 2 Typen von Asci: Typ I = Merkmal postreduziert, Typ II = Merkmal präreduziert.

Alle im Verlauf unserer Untersuchungen isolierten Einzelsporenpaare können zur Ermittlung der Postreduktionsfrequenz des Kreuzungstyps benutzt werden, denn die Partner einer Kreuzung sind immer für $+/-$ heterogen. Zur Feststellung des Reduktionstyps der anderen Gene kann man die Sporenpaare für jeden Faktor auswerten, durch den sich ihre Eltern unterscheiden. Dies soll an einem Beispiel erläutert werden: Der gemischtsporige Ascus mit dem Einzelsporenpaar $g_1(tuv_1abc+)/s_1(tuvabc-)$, der aus der Kreuzung $g_5(tuv_1abc_1+) \times s_1(tuvabc-)$ stammt, in der die Eltern sich durch v/v_1 , c/c_1 und $+/-$ unterscheiden, ist für v/v_1 und $+/-$ postreduziert (= Typ I) und für c/c_1 präreduziert (= Typ II).

In Tabelle 5 sind die Prozentsätze der Post- und Präreduktion der von uns untersuchten Gene verzeichnet.

Die für das Allelenpaar $-/-$ gefundenen Werte weisen keine gesicherte Differenz zu den von RIZET und ENGELMANN (1949) ermittelten Werten auf (Typ I: 97,5; Typ II: 2,5).

Unterscheiden sich die Partner einer Kreuzung durch mehrere Erbfaktoren, so werden diese Merkmale bei Fehlen von Koppelung unabhängig voneinander reduziert. Bei Vorliegen einer Koppelung ist ihr Reduktionstyp mehr oder weniger voneinander abhängig. Zur Feststellung der Kopplung oder der freien Spaltung von Genen werden bei polygener Differenz in den Ascis nur je 2 Merkmale auf ihr Reduktionsverhalten untersucht. Bei einer solchen digenen Verschiedenheit gibt es 4 Möglichkeiten der Kombination von Post- und Präreduktion der beiden Faktoren (RIZET und ENGELMANN 1949). In Abb. 10 ist dies schematisch für die Gene t und a aus der Kreuzung s_1 ($tuvabc+$) \times i_3 ($t_1uva_1b_1c-$) dargestellt.

Tabelle 5. *Prozentsatz der Post- und Präreduktion der Faktoren, die für die Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen den Stämmen M und s verantwortlich sind*

Genpaar	Anzahl der Ascis	Reduktion in Prozent	
		Typ I postreduziert	Typ II präreduziert
t/t_1	394	$14,9 \pm 1,79$	$85,1 \pm 1,79$
u/u_1	187	$7,5 \pm 1,93$	$92,5 \pm 1,93$
v/v_1	454	$33,7 \pm 2,22$	$66,3 \pm 2,22$
a/a_1	445	$20,9 \pm 1,93$	$79,1 \pm 1,93$
b/b_1	483	$10,1 \pm 1,37$	$89,9 \pm 1,37$
c/c_1	314	$73,6 \pm 2,49$	$26,4 \pm 2,49$
	828	$96,9 \pm 0,60$	$3,1 \pm 0,60$

Zu den Mittelwerten ist der einfache mittlere Fehler angegeben. Die Versuchstemperatur lag in allen Fällen bei 26°C.

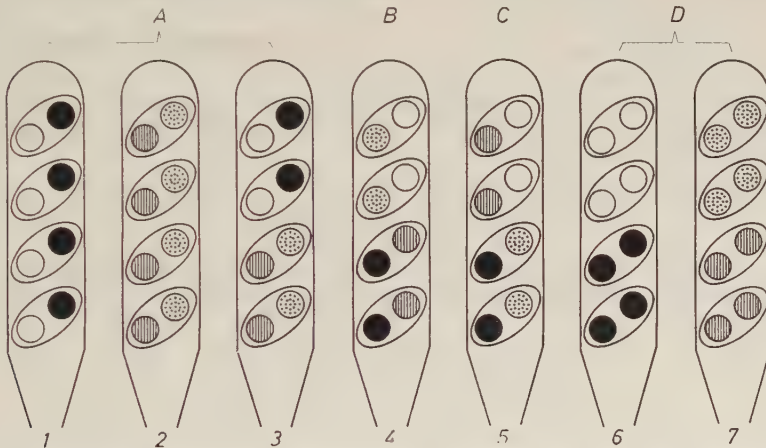


Abb. 10. Schematische Darstellung der möglichen Ascustypen aus der Nachkommenschaft von Stämmen, die sich durch 2 Gene unterscheiden. Nähere Erläuterungen werden im Text gegeben. (Nach RIZET und ENGELMANN 1949, verändert)

In Gruppe A (Ascis 1—3) sind t/t_1 und a/a_1 beide postreduziert. Alle drei Ascis gehören für beide Gene zum Typ I. Ascus 1 enthält nur die Elternkerne ta (weiß) und t_1a_1 (schwarz), Ascus 2 die Rekombinationskerne t_1a (punktiert) und ta_1 (schraffiert) und Ascus 3 in der einen Hälfte die Parentaltypen und in der anderen die Rekombinationstypen. In Gruppe B (Ascus Nr. 4) ist t/t_1 postreduziert (Typ I) und a/a_1 präreduziert (Typ II). Jede Ascushälfte enthält die Kerne eines Elters und eines Rekombinationstyps. Dies gilt auch für Gruppe C in der t/t_1 zum Typ II und a/a_1 zum Typ I gehört. In Gruppe D (Ascis 6 und 7) sind beide Genpaare präreduziert (Typ II). Ascus 6 enthält in der einen Hälfte die Kerne des einen

Eltern und in der anderen Hälfte die Kerne des anderen. In Ascus 7 sind die Ascushälften homogen für die Rekombinationskerne.

Wenn ein gemischtsporiger Ascus aus einer F_1 stammt, deren Eltern sich durch 2 bekannte Gene unterscheiden, läßt er sich auf Grund des Genotyps eines Einzelsporenpaares eindeutig einer der Gruppen $A—D$ und innerhalb der Gruppe D dem Ascus Nr. 6 oder 7 zuordnen. Das Sporenpaar t_1a/t_1a gehört beispielsweise zum Ascus Nr. 7 der Gruppe D . Innerhalb von Gruppe A kann die Zugehörigkeit zu den Asci 1—3 mit Hilfe von Sporenpaaren nicht eindeutig bestimmt werden, z. B. kann das Paar ta/t_1a_1 sowohl zu 1 als auch zu 3 gehören. Um in Gruppe A eine eindeutige Zuordnung treffen zu können, muß der Genotyp beider Ascushälften bekannt sein. Dies ist aber für unsere Erfordernisse nicht notwendig, denn zur Feststellung, ob 2 Gene miteinander gekoppelt sind oder nicht, genügt eine eindeutige Zuordnung der Asci zu den Gruppen $A—D$ und innerhalb der Gruppe D eine Unterteilung in Parental -oder Rekombinationstyp.

Um zwischen freier Spaltung und Koppelung unterscheiden zu können, geht man am besten von den Voraussetzungen aus, die bei freier Spaltung gegeben sind:

1. Jeder der beiden Faktoren wird unabhängig vom anderen post- oder präreduziert gemäß seiner berechneten Frequenz (s. Tabelle 5). Die Verteilung der Asci einer F_1 auf die Gruppen $A—D$ ist durch die Post- und Präreduktionsfrequenz der beiden Faktoren festgelegt (Methode I).

2. Das Verhältnis von Asci mit Elternkernen (Abb. 10, Nr. 6) zu solchen mit Rekombinationskernen (Nr. 7) muß 1:1 sein (Methode II). Jede dieser beiden Voraussetzungen reicht allein aus, um die freie Spaltung zu beweisen. Trifft keine zu, so liegt Koppelung vor.

Für die Gene t und a fanden wir folgende Werte: von 149 Asci verschiedener Kreuzungen, die für t/t_1 und a/a_1 heterogen waren, gehörten 5 zur Gruppe A , 14 zur Gruppe B , 19 zur Gruppe C , 111 zur Gruppe D (davon 60 zu Ascus Nr. 6 und 51 zu Ascus Nr. 7). Diese Zahlenwerte der gefundenen Verteilung ($=g$) können nach den beiden oben charakterisierten Methoden ausgewertet werden:

1. Die Reduktionsprozentsätze für die Gene t und a betragen (s. Tabelle 5):

$$\begin{array}{l} t/t_1 \text{ 14,9 (Typ I), 85,1 (Typ II)} \\ a/a_1 \text{ 20,9 (Typ I), 79,1 (Typ II).} \end{array}$$

Daraus lassen sich, bei Annahme einer freien Mendelspaltung, die Prozentsätze für die Verteilung einer F_1 , deren Eltern für t/t_1 und a/a_1 heterogen waren, auf die Gruppen $A—D$ berechnen:

$$\begin{array}{l} \text{Gruppe } A: 14,9\% \times 20,9\% = 3,1\% \\ \text{Gruppe } B: 14,9\% \times 79,1\% = 11,79\% \\ \text{Gruppe } C: 85,1\% \times 20,9\% = 17,79\% \\ \text{Gruppe } D: 85,1\% \times 79,1\% = 67,31\% \end{array}$$

Aus den für die Gruppen berechneten Prozentsätzen berechnen wir nun die theoretisch zu erwartende Verteilung der 149 Asci auf die Gruppen $A—D$. Nach dieser berechneten Verteilung ($=b$) müssen in Gruppe A 4,6, in Gruppe B 17,6, in Gruppe C 26,5 und in Gruppe D 100,3 Asci enthalten sein. Die Übereinstimmung der gefundenen Werte (g) mit den berechneten (b) läßt sich mit Hilfe des χ^2 -Testes prüfen. Wir erhalten ein χ^2 von 3,931 und bei 3 Freiheitsgraden einen P -Wert von 0,3—0,2. Damit ist die Übereinstimmung gesichert. Die Gene t und a sind nicht gekoppelt.

2. In Gruppe D erhielten wir 60 Asci vom Elterntyp und 51 vom Rekombinationstyp. Dies ist eine gesicherte 1:1-Aufspaltung, die bei einem $\chi^2 = 0,730$ und $N = 1$ eine $P = 0,5$ bis 0,3 besitzt. t und a sind also auch auf Grund des 1:1-Verhältnisses von Elterntyp: Rekombinationstyp nicht gekoppelt.

Mit Hilfe von Methode I oder II wurden die Koppelungsbeziehungen zwischen den Genen t , u , v , a , b , c , $+$ untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6 enthält in der 3. Spalte die im Experiment gefundenen Werte (g) für die Verteilung der Gesamtzahl der Ascii auf die Gruppen $A—D$. Bei Kombinationen, in denen der Test nach Methode I erfolgte, sind in Spalte 3 noch die Werte für die berechnete Verteilung (b) verzeichnet. Zur Berechnung von b wurden die Post- und Präreduktionswerte aus Tabelle 5 entnommen. In der 8. und 9. Spalte ist die Verteilung der Werte der Gruppe D auf Elterntyp (Nr. 6) und Rekombinationstyp (Nr. 7) angegeben.

Tabelle 6. Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen über die Koppelungsbeziehungen zwischen den Genen t , u , v , a , b , c , $+$ (Erläuterungen s. Text)

Gene	Anzahl der Ascii	Verteilung der Ascii auf die Gruppen:				Gruppe D		Statistische Sicherung nach:			
		A	B	C	D	Nr. 6	Nr. 7	Methode I $N = 3$		Methode II $N = 1$	
								χ^2	P -Wert	χ^2	P -Wert
t/u	187	g 9	18	5	155	80	75			0,162	0,7—0,5
		b									
t/v	194	g 6	20	55	113	56	57			0,002	0,95—0,9
		b									
t/a	149	g 5	14	19	111	60	51	3,931	0,3—0,2	0,730	0,5—0,3
		b 4,6	17,6	26,5	100,3						
t/b	239	g 16	19	16	188	183	5	49,16	< 0,0002		
		b 3,6	32	20,6	182,8						
t/c	184	g 20	6	110	48	28	20	1,489	0,7—0,5		
		b 20,2	7,2	115,2	41,4						
$t/+$	347	g 46	3	283	15	8	7	5,086	0,2—0,1		
		b 50,1	1,6	286	9,3						
u/v	160	g 7	4	40	109	60	49			1,053	0,5—0,3
		b									
u/a	149	g 4	5	22	118	67	51	5,240	0,2—0,1	2,170	0,2—0,1
		b 2,3	8,8	28,8	109						
u/b	160	g 8	3	11	138	70	68			0,028	0,9—0,8
		b									
u/c	172	g 6	4	112	50	24	26	3,105	0,5—0,3		
		b 9,5	3,4	117,1	42,1						
$u/+$	164	g 10	1	145	8	4	4	3,363	0,5—0,3		
		b 11,9	0,4	147	4,8						
v/a	111	g 11	25	14	61	31	30	5,901	0,2—0,1	0,008	0,95—0,9
		b 7,8	29,6	15,4	58,2						
v/b	141	g 6	35	6	94	45	49	4,497	0,3—0,2	0,170	0,7—0,5
		b 4,8	42,7	9,4	82,6						
v/c	202	g 50	20	94	38	19	19	0,654	0,9—0,8		
		b 50,1	17,9	98,6	35,4						
$v/+$	310	g 114	3	188	5	3	2	2,840	0,5—0,3		
		b 101,2	3,3	199,1	6,4						
a/b	354	g 11	59	18	266	129	137			0,240	0,7—0,5
		b									
a/c	187	g 24	14	108	41	28	13	2,227	0,7—0,5		
		b 28,8	10,3	108,8	39,1						
$a/+$	244	g 59	3	173	9	4	5	5,518	0,2—0,1		
		b 49,4	1,6	187	6,1						
b/c	103	g 7	6	68	22	12	10	3,976	0,3—0,2		
		b 7,7	2,8	68,1	24,5						
$b/+$	277	g 18	2	249	8	5	3	4,707	0,2—0,1		
		b 27,2	0,9	241,1	7,8						
$c/+$	117	g 85	2	29	1	—	1	0,239	0,98—0,95		
		b 83,4	2,7	29,9	1						

Tabelle 6 zeigt, daß *nur die Gene t und b gekoppelt sind*. t und b gehören nicht nur zu einer Koppelungsgruppe, sondern *sie liegen auch auf dem gleichen Chromosomenarm*, denn ihr Austauschwert von 2,7 (— Prozentsatz der Rekombinationsasci in Gruppe D) unterscheidet sich nur unwesentlich von der Differenz (2,4) der beiden Genorte von b (Locus = 5,1) und t (Locus = 7,5). Da die Postreduktionsfrequenzen von t und b äußerst niedrig sind, kann bei Berechnung der Genorte das Vorkommen von mehrfachem crossing-over vernachlässigt werden. Die Loci dieser Gene sind demnach gleich der halben Postreduktionsfrequenz. *Für alle anderen Kombinationen läßt sich eine Koppelung statistisch nicht sichern*.

Es ist aber durchaus möglich, daß für das eine oder das andere Genpaar eine schwache Koppelung vorhanden ist. Dies kann der Fall sein, wenn die Postreduktionsfrequenz von 2 Genpaaren sehr verschieden ist, wie dies z. B. für die Gene t, u, a, b , einerseits und den Kreuzungstyp $+$ andererseits zutrifft. In diesen Fällen kann durch mehrfaches crossing-over oder durch ein zwischen dem $+$ -Locus und dem Centromer vorhandenes Dauerschisma (s. dazu Einzelheiten bei RIZET und ENGELMANN 1949) ein unabhängiges mendeln der genannten Faktoren vorgetäuscht werden. Ferner besteht noch die Möglichkeit, daß Gene, die nach Tabelle 6 frei spalten, auf verschiedenen Armen des gleichen Chromosoms lokalisiert sind.

Die enge Koppelung zwischen t und b ist für die unterschiedliche Verteilung der Stämme auf die Untergruppen in der F_1 von $M \times s$ verantwortlich (s. Tabelle 3). In Gruppen, die t tragen (s, g, k, l), sind die Untergruppen 1 und 5, die das Gen b besitzen, stärker vertreten. In den t_1 -Gruppen (M, i, j, h) sind die b_1 -Untergruppen 3, 4, 7, 8 am häufigsten.

IV. Besprechung der Versuchsergebnisse

1. Die Dominanzbeziehungen der Barrage- und Incompatibilitätsallele

Eine echte Dominanz gibt es bei den Ascomyceten nicht, da bei ihnen keine Diplophase vorliegt. Man spricht bei *Podospira anserina* von Dominanz (RIZET und ENGELMANN 1949), wenn der Phänotyp eines Heterocaryons von *einem* und nicht von beiden Genen eines Allelenpaares bestimmt wird, z. B. wenn die dikaryotische Spore P/p normal groß ist (P = normale Sporengröße; p = Zwergspore). Die Feststellung einer Dominanz im erweiterten Sinne ist also dann möglich, wenn ein Heterokaryon Kerne besitzt, deren Gene im Dominanz-Rezessivitätsverhältnis stehen.

Die Barrage- und Incompatibilitätsgene sind in gleicher Weise wie das Kreuzungstyp-Allelenpaar $(+/-)$ für das Verhalten von *Haplonten* verantwortlich. Deswegen kann ihre Allelenpotenz nur in Kreuzungen ermittelt werden, wie dies am Beispiel von t/t klar wird: Das Heterokaryon t/t_1 ist sehr instabil. Es neigt zur Bildung von t - oder t_1 -Sektoren, die sich gegenseitig durch Barragebildung abgrenzen. Bei Gegenüberstellung des Heterokaryons t/t_1 mit einem t - oder einem t_1 -Stamm bildet sich stellenweise Barrage oder nicht. Phänotypisch verhält sich also das Heterokaryon t/t_1 als ob in manchen Zonen t_1 in anderen t dominant wäre. Das Auftreten der t bzw. t_1 zugeordneten Merkmale ist jedoch auf eine Kernentmischung zurückzuführen. Sie läßt sich durch Test der betreffenden Zonen nachweisen. In gleicher Weise verhalten sich auch die mehr oder weniger schlecht balancierten Heterokaryons u/u_1 . Die Heterokaryons v/v_1 besitzen eine größere Stabilität und zeigen in manchen Fällen eine schwache Dominanz von v über v_1 , d. h. sie bilden mit v_1 -Testern eine schwach ausgeprägte Barrage, mit v -Stämmen aber normalen Kontakt.

Das balancierte Heterokaryon b/b_1 zeigt keine Kernentmischung. Beide b -Faktoren sind gleichwertig. Die Heterokaryons a/a_1 und c/c_1 besitzen dasselbe Verhalten. Sie sind aber nur balanciert zu erhalten, wenn die beiden Kerne für b_1 bzw. v_1 homogen sind (ab_1 bzw. cv_1). Wenn b bzw. v in einem der beiden Kerne vorkommt, sind sie nicht stabil, da b in Zusammenarbeit mit a_1 (entsprechend v mit c_1) die Lebensfähigkeit der Kerne stark vermindert. Da in diesen Heterokaryons die Vermehrung der einen Kernsorte (a_1b bzw. c_1v) stark herabgesetzt ist, besitzt nach einiger Zeit ein ursprüngliches a/a_1 - bzw. c/c_1 -Heterokaryon nur noch a - bzw. c -Eigenschaften.

Da bei keinem der untersuchten Barrage- und Incompatibilitätsallele eine ausgeprägte Dominanz oder Rezessivität nachgewiesen werden konnte, müssen die Allele eines Genpaares als gleichwertig angesehen werden. Sie wurden aus diesem Grunde mit kleinen Buchstaben bezeichnet und durch Zufügen des Index 1 voneinander unterschieden.

2. Die Incompatibilitätsverhältnisse von *Podospora anserina*

Zwischen homokaryotischen Myzelien von *P. anserina* bestehen bipolare Incompatibilitätsbeziehungen, die durch den Kreuzungstyp (+/—) bestimmt werden. Zusätzlich zur Unverträglichkeit bei gleichem Kreuzungstyp existieren zwischen geographischen Rassen von *Podospora* noch weitere, verschiedene Incompatibilitätsbeziehungen, die immer mit Barragebildung verbunden sind. Die genetischen Bedingungen der Barrage- und Semi-Incompatibilität, die zwischen zwei dieser Rassen, den Stämmen M und s , vorhanden sind, wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Wir fanden, daß sich M und s durch die Allelenpaare t/t_1 , u/u_1 , v/v_1 , a/a_1 , b/b_1 , c/c_1 unterscheiden, die sowohl für die Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen M und s als auch für die Beziehungen zwischen den Rekombinationstypen der F_1 verantwortlich sind. Eine übersichtliche Darstellung der Genwirkung dieser 6 Allelenpaare ist in Tabelle 7 gegeben.

Wie Tabelle 7 zeigt, bestehen zwischen 2 Stämmen, die einen verschiedenen Kreuzungstyp besitzen, die folgenden Relationen:

Tabelle 7. Die Bestimmung der Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen Stämmen von verschiedenem Kreuzungstyp durch die Gene t , u , v , a , b , c

Nr.	Kontakt	Fertilität	Zeichen	Partner unterscheiden sich durch
1	normaler Kontakt	Compatibilität		keinen Faktor oder durch a/a_1 , b/b_1 , c/c_1 , bc/b_1c_1 , b_1c/bc_1
2	Barrage	Semi-Incompatibilität		ab/a_1b_1 , cv/c_1v_1 , $abcv/a_1b_1c_1v_1$
3	Barrage	Incompatibilität		abc_1v_1/a_1b_1cv
4	Barrage	Compatibilität		mindestens ein Genpaar von t/t_1 , u/u_1 , v/v_1 oder noch zusätzlich durch verschiedene a -, b -, c -Gene, außer den unter Nr. 2 und 3 aufgeführten Kombinationen

1. Ein normaler Kontakt verbunden mit Compatibilität (Tabelle 7, Nr. 1) bildet sich nicht nur zwischen genetisch gleichen Partnern (mit Ausnahme des

Kreuzungstyps $+/-$ (Abb. 12, linke Hälfte), sondern auch zwischen Stämmen, die für die Gene a , b , c und die Kombination bc heterogen sind.

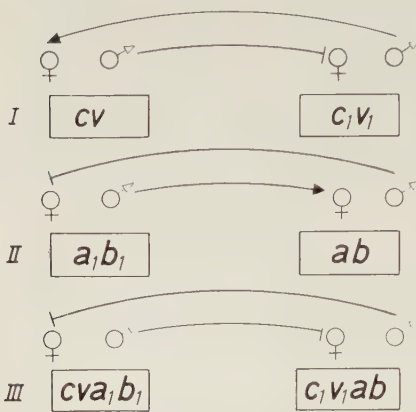


Abb. 11. Schematische Darstellung der genetischen Bedingungen der Inkompatibilitätsverhältnisse von *Podospora anserina*. Eine Kompatibilität ist nur in Richtung der Pfeile vorhanden

Bei der Kreuzung der Eltern M und s besitzt der eine Stamm (M) die Gene c_1v_1 und a_1b_1 , der andere Stamm (s) deren Allele cv und ab .



Abb. 12. Genetische Bedingungen für die Semi-Inkompatibilität und totale Inkompatibilität zwischen verschiedenen Stämmen von *Podospora anserina*

Das Vorhandensein von Semi-Inkompatibilität ist demnach maßgebend für das Phänomen der totalen Inkompatibilität zwischen Stämmen, die auf Grund ihres verschiedenen Kreuzungstyps dazu befähigt wären, miteinander zu fruktifizieren.

2. Eine Barrage wird sowohl durch Gene bedingt, die für die Inkompatibilität verantwortlich sind (v , a , b), als auch durch solche, die beim Auftreten der Inkompatibilität keine Rolle spielen (t , u). Es kann also bei Barragebildung Semi-Inkompatibilität, Inkompatibilität und Kompatibilität vorhanden sein.

a) Die Semi-Inkompatibilität wird durch zwei verschiedene Mechanismen bestimmt (Tabelle 7, Nr. 2), die aus je 2 Genpaaren bestehen: c/c_1 , v/v_1 und a/a_1 , b/b_1 . Sie zeigt sich, wenn ein Kreuzungspartner die Gene cv bzw. ab trägt und der andere c_1v_1 bzw. a_1b_1 (Abb. 11, I, II; Abb. 12, untere bzw. obere Hälfte). Fruchtkörper bilden sich nur auf der Seite von ab bzw. cv . Die Bar-

rage wird entweder durch ein Genpaar (v/v_1) oder durch das Zusammenwirken beider Genpaare (a/a_1 , b/b_1) hervorgerufen. Bei der Kreuzung der Eltern M und s besitzt der eine Stamm (M) die Gene c_1v_1 und a_1b_1 , der andere Stamm (s) deren Allele cv und ab . In dieser Kombination sind also beide Mechanismen vorhanden. Sie wirken beide in gleicher Richtung und verhindern die Fruchtkörperbildung des Stammes M .

b) Für die Entstehung der totalen Inkompatibilität sind 2 Voraussetzungen notwendig (Tabelle 7, Nr. 3), nämlich beide Semi-Inkompatibilitätsmechanismen müssen gegeneinander wirken, so daß durch $cv \times c_1v_1$ die Perithezienbildung des einen Partners und durch $ab \times a_1b_1$ die des anderen

c) Zwei Stämme sind miteinander kompatibel (Tabelle 7, Nr. 4), wenn sie mindestens für einen der 3 Faktoren t, u, v heterogen sind und nicht die genetischen Differenzen cc/c_1v_1 und ab/a_1b_1 besitzen, die zum Zustandekommen der Semi-Inkompatibilität notwendig sind.

Zur Manifestierung einer Inkompatibilität ist also die Bildung einer Barrage notwendig. Beide Phänomene sind durch das Zusammenspiel der gleichen Genpaare bestimmt.

Wenn man den einen oder den anderen Mechanismus der Semi-Inkompatibilität betrachtet, so erhebt sich die Frage, ob die gleichen Gene in anderer Vereinigung, d. h. statt $cc \times c_1v_1$ in der Kombination $c_1v \times cv_1$ (bzw. statt $ab \times a_1b_1$, $a_1b \times ab_1$), den gleichen Effekt besitzen. Dies ist nicht festzustellen, denn die Stämme c_1v und a_1b können wegen ihrer herabgesetzten Vitalität nicht getestet werden.

Eine Deutung der physiologischen Grundlagen der Semi-Inkompatibilität ist zur Zeit nicht möglich, da noch nicht bekannt ist, in welchem Entwicklungsstadium der Fruchtkörperbildung der Inkompatibilitätseffekt auftritt. Bei *Bombardia lunata* fand ZICKLER (1952), daß in kompatiblen Verbindungen die Trichogyne von den Spermogonien bzw. Spermarien angelockt wird, während dies in inkompatiblen Verbindungen nicht beobachtet werden konnte. Das Fehlen einer Anlockung der Trichogyne durch männliche Organe bzw. Gameten ist aber sowohl für die Realisation der bipolaren Inkompatibilität als auch für das Zustandekommen der Semi-Inkompatibilität von *Podospora* nicht verantwortlich, denn bei künstlichen Spermatisierungen gelangen stets, rein zufällig, Spermarien an Trichogynen. Bei inkompatiblen Stämmen haben diese Spermatisierungen niemals Erfolg. Damit wäre das Problem zunächst auf die Frage eingeeengt: Können in inkompatiblen Kreuzungen Spermarien in die Trichogynen einwandern oder nicht. Bei der bipolaren Inkompatibilität erfolgt kein Einwandern des Spermarieninhaltes in die Trichogyne. Für die inkompatiblen Verbindungen zwischen semi-inkompatiblen Partnern ist darüber noch nichts bekannt.

Plasmatische Unterschiede, wie sie bei Kreuzungen von Blütenpflanzen mit nichtreziproken Unterschieden bekannt sind [vgl. die zusammenfassenden Darstellungen von OEHLKERS (1952) und MICHAELIS (1954)], können zur Erklärung der nichtreziproken Inkompatibilität zwischen den Stämmen M und s von *Podospora* nicht herangezogen werden, denn alle Stämme der F_1 von $M \times s$ besitzen in überwiegendem Maße s -Plasma, da sich nur die s -Ascogene zu Perithezien entwickeln können. Die M -Stämme aus dieser F_1 , die also alle s -Plasma enthalten, zeigen aber das gleiche Inkompatibilitätsverhalten wie der Elter M mit M -Plasma.

3. Vergleich der Inkompatibilitätsmechanismen von *Podospora* mit den bei Pilzen und Blütenpflanzen bekannten Systemen

Bei selbstincompatiblen Pilzen und Blütenpflanzen sind stets Kreuzungen genetisch gleicher Organismen inkompatibel. Diesem Gesetz gehorchen auch die verschiedenen Inkompatibilitätssysteme der *Compositen*, die nicht reziproke Unterschiede aufweisen [GERSTEL und RINER (1950), HUGHES und BABCOCK (1950), CROWE (1954a, 1954b)]. Auch die durch den Kreuzungstyp bedingte Inkompatibilität von *Podospora* beruht auf der Unverträglichkeit homogener

Gameten. Aber im Gegensatz dazu wird die zusätzlich zum bipolaren Heterothallismus vorhandene *nicht reziproke Incompatibilität von Podospora nur dann realisiert, wenn die Kreuzungspartner an 2 Loci heterogen sind. Die totale Incompatibilität erfordert sogar eine tetragene Differenz.* Während bei Pilzen und Blütenpflanzen, bei denen mehr als ein Genpaar für die Incompatibilität verantwortlich ist, die Compatibility der Gameten zunimmt, je stärker sie genetisch differieren, ist bei *Podospora* gerade das Umgekehrte der Fall. Aus diesem Grunde sind die *Mechanismen der Semi-Incompatibilität* vor allem, wenn sie gegeneinander wirken und eine totale Incompatibilität hervorrufen, *kein Mittel zur Inzuchtverhinderung.* Im Gegenteil, sie verringern das outbreeding und unterscheiden sich somit ganz wesentlich von allen bisher bekannten Incompatibilitätsmechanismen, die alle das outbreeding fördern.

Die nichtreziproken Incompatibilitätsmechanismen von *Podospora* besitzen auch eine andere genische Grundlage als die nichtreziproken Unterschiede, die bei *Schizophyllum* (KNIEP 1929, PAPAZIAN 1950, 1951) durch Pseudoallelie und bei *Primula* (ERNST 1953, 1955), *Oenothera* (LEWIS 1949) und *Prunus* (LEWIS und CROWE 1954) durch die komplexe Natur der Incompatibilitätsgene gegeben sind; denn solche zusammengesetzten Supergene wurden bei *Podospora* nicht gefunden.

Zusammenfassung

1. Die Stämme *M* und *s* von *Podospora anserina*, die eine verschiedene geographische Herkunft besitzen, bilden bei Gegenüberstellung auf einem künstlichen Nährmedium statt des sonst üblichen normalen Kontaktes eine Barrage (= Trennungszone). Dafür sind nach den Befunden von RIZET u. a. die Allelenpaare t/t_1 , u/u_1 und v/v_1 verantwortlich.

2. Zwischen haploiden, hermaphroditen Stämmen von *M* und *s* besteht zusätzlich zur normalen bipolaren Incompatibilität eine nichtreziproke Incompatibilität (= Semi-Incompatibilität), d. h. die Ascogone des Stammes *s* können von den Spermatien des Stammes *M* befruchtet werden, aber die reziproke Kreuzung $\text{♀}M \times \text{♂}s$ ist inkompatibel. Wie durch Spermatisierungen bewiesen werden konnte, handelt es sich dabei um eine echte Incompatibilität.

3. Eine Gegenüberstellung von homokaryotischen Stämmen aus der F_1 von $M \times s$, die einen verschiedenen Kreuzungstyp besitzen, ergab die folgenden Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen:

- a) Normaler Kontakt mit totaler Compatibility,
- b) Barrage mit totaler Compatibility,
- c) Barrage mit Semi-Incompatibilität,
- d) Barrage mit totaler Incompatibilität.

Die partielle oder totale Incompatibilität ist also immer mit der Bildung einer Barrage verbunden.

4. Die genetische Analyse der Stämme *M* und *s* hinsichtlich der Kontaktbeziehungen und der Fruchtkörperbildung ergab die folgenden genetischen Formeln für die beiden Stämme:

$$M = t_1, u_1, v_1, a_1, b_1, c_1 \quad s = t, u, v, a, b, c$$

Mit Ausnahme der Allelenpaare t/t_1 und b/b_1 , die eng gekoppelt sind und auf dem gleichen Chromosomenarm liegen, konnten keine anderen Koppelungsbeziehungen zwischen diesen Genen nachgewiesen werden.

5. Die Semi-Inkompatibilität, die zwischen den Stämmen M und s bei verschiedenem Kreuzungstyp besteht, wird durch 2 Gensysteme ausgelöst, deren Wirkung identisch ist. Jedes der beiden Systeme genügt allein, um das gleiche Phänomen hervorzurufen. Das erste System wird bestimmt durch die Kombination $ab \times a_1b_1$ und das zweite durch $cv \times c_1v_1$. Perithezien bilden sich nur auf der Seite der Stämme ab bzw. cv . Eine Kreuzung von Stämmen mit den Genotypen $a b c_1 v_1$ und $a_1 b_1 c v$ hat die totale Inkompatibilität zur Folge.

6. Die wesentlichste Eigenschaft dieses neuen Inkompatibilitätstypus ist, daß sich eine Inkompatibilität nie zwischen genetisch gleichen Organismen zeigt, wie dies im Gegensatz dazu bei den anderen bekannten Inkompatibilitätssystemen der Pilze und Blütenpflanzen (auch bei nichtreziproken Verschiedenheiten) der Fall ist.

7. Da die totale Inkompatibilität nur bei heterogenen Organismen auftritt, wird durch sie die Inzucht gefördert.

8. Zwischen Barragebildung und Inkompatibilität bestehen enge Beziehungen, denn in den Fällen, wo Inkompatibilität vorliegt, wird durch die Inkompatibilitätsgene auch das Auftreten einer Barrage bewirkt (polyphäre Gene).

9. Die Kontakt- und Fertilitätsbeziehungen zwischen bestimmten Stämmen ($a_1b \times ab_1$ und $c_1v \times cv_1$) konnten wegen der verminderten Lebensfähigkeit der Stämme a_1b und c_1v nicht untersucht werden.

Résumé

1. Deux souches d'origines géographiques différentes de *Podospora anserina* appelées M et s forment un barrage lorsqu'on les confronte sur un milieu artificiel. On savait déjà que trois couples de gènes au moins t/t_1 , u/u_1 , v/v_1 interviennent dans le déterminisme du phénomène.

2. En dehors de l'hétérothallisme habituel que l'on rencontre aussi bien chez les souches M que chez les souches s , les croisements $M \times s$ ($+ M \times - s$ ou $- M \times + s$) montrent un autre type d'incompatibilité; le croisement n'est possible qu'entre organes ♀ s et organes ♂ M , qu'on réalise des cultures ou qu'on opère par spermatisation. Nous avons appelé semi-incompatibilité cette incompatibilité non-réciproque.

3. Lorsqu'on confronte entre elles, deux à deux, les souches homocaryotiques de signe différent issues du croisement $M \times s$, un certain nombre d'éventualités sont possibles: a) contact normal et compatibilité totale; b) barrage et compatibilité totale; c) barrage et semi-compatibilité; d) barrage et incompatibilité totale. Ainsi l'incompatibilité, qu'elle soit totale ou partielle, est toujours associée à la présence d'un barrage.

4. L'analyse génétique des souches M et s en ce qui concerne la présence ou l'absence d'un barrage et les phénomènes de compatibilité ou d'incompatibilité a montré que les formules suivantes pouvaient être affectées à chacune de ces souches: $M = t_1 u_1 v_1 a_1 b_1 c_1$; $s = t u v a b c$. En dehors des couples t/t_1 et b/b_1 étroitement liés, aucune autre relation de linkage n'a pu être établie entre ces gènes.

5. La semi-incompatibilité entre souches M et s de signe différent est le résultat de l'intervention de deux mécanismes dont l'action est identique, chacun d'eux étant suffisant pour produire le phénomène. Le premier intéresse les deux

couples ab et a_1b_1 ; le second les couples cv et c_1v_1 . Les périthèces ne se forment que sur les souches ab ou cv . L'utilisation de souches abc_1v_1 et a_1b_1cv conduit alors à une incompatibilité totale.

6. Le caractère essentiel du nouveau type d'incompatibilité décrit réside dans le fait que cette incompatibilité ne se produit jamais entre deux souches génétiquement identiques, contrairement à ce qui se passe pour les autres types d'incompatibilité connus, qu'ils intéressent les organismes supérieurs ou inférieurs, qu'il s'agisse d'une incompatibilité réciproque ou non réciproque. Chacun des deux mécanismes d'incompatibilité décrits fait intervenir deux couples de gènes indépendants.

7. Les gènes qui déterminent le phénomène d'incompatibilité jouent également un rôle dans le déterminisme de la formation des barrages. On peut donc penser qu'il y a des rapports étroits entre la réalisation de ces deux phénomènes.

8. Quelques relations intéressant la compatibilité ou les caractères du contact entre certaines souches (a_1b et ab_1 ; c_1v et cv_1) n'ont pu être établies à cause du comportement très particulier des souches a_1b et c_1v qui sera envisagé ultérieurement.

Summary

1. The strains M and s of *Podospira anserina* with different geographical origins, when cultured together on an agar-medium, form a barrage instead of a normal contact. The factors t/t_1 , u/u_1 , v/v_1 are responsible for the barrage according to RIZET.

2. Between haploid hermaphrodite strains of M and s , there exists a normal bipolar incompatibility determined by the mating types. In addition to this phenomenon we also find another type of incompatibility which is not reciprocal, i.e. the ascogones of strain s can be fertilized by the spermatia of M , but the reciprocal crossing ($\varnothing M \times \sigma s$) is incompatible. This is demonstrated by spermatisations.

3. The confrontations arising out of matings between different F_1 strains of $M \times s$, reveal the following relations of contact and fertility: a) normal contact and compatibility, b) barrage and semi-incompatibility, c) barrage and incompatibility, d) barrage and compatibility. The partial or total incompatibility is thus always connected with the formation of a barrage.

4. After analyzing the genetical behavior of the strains M and s and of their offsprings, we can deduce the following genetic formulae for M and s : $M = t_1 u_1 v_1 a_1 b_1 c_1$; $s = t u v a b c$. After determining the linkage relations between these genes we found that only t and b are linked and closely localized on the same arm of a chromosome.

5. The semi-incompatibility, which exists between the strains M and s , is determined by two mechanisms with identical effect. Each of them is sufficient to produce the phenomenon. The first mechanism is established by the combination $ab \times a_1b_1$ and the second by the combination $cv \times c_1v_1$. Perithecia are only formed on the side of the strain which contains either ab or cv . Two strains having the genic combination, abc_1v_1 and a_1b_1cv , when mated, give the total incompatibility.

6. The most essential property of this new type of incompatibility consists in the fact that an incompatibility is never produced between genetically identical

organisms, in contrast to the incompatibility systems shown in higher and lower plants, even if there are reciprocal differences.

7. Therefore the mechanism of total incompatibility, which exists only between organisms of different genotype, promotes the inbreeding and not the outbreeding, which is always favoured by the known incompatibility systems.

8. The incompatibility factors are also responsible for the formation of barrage. We can therefore conclude, that incompatibility and barrage are closely related.

9. The contact and fertility relations between certain strains ($a_1b \times ab_1$; $c_1v \times cv_1$) can not be analysed, because the strains a_1b and c_1v show reduced vitality. This point will be reported in a later communication.

Die Versuche wurden im November 1952 im Laboratoire de Génétique der Universität Paris begonnen und im Botanischen Institut der Universität Köln mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft fortgesetzt. Der Aufenthalt in Paris wurde durch ein Stipendium der französischen Regierung ermöglicht. Herrn Dr. GEORGES RIZET, Maitre de Conférence, bin ich für die Überlassung des Pilzmaterials und seine überaus hilfreiche und freundschaftliche Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Herrn Professor Dr. BORIS EPHRUSSI danke ich für die herzliche Aufnahme, die er mir in seinem Institut gewährte. Herrn Professor Dr. JOSEPH STRAUB, Köln, danke ich für das fördernde Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Literatur

- AMES, L. M.: An hermaphrodite self-sterile but cross-fertile condition in *Pleurage anserina*. Bull. Torrey Bot. Club. **59**, 341—345 (1932). — Hermaphroditism involving self-sterility and cross-fertility in the ascomycete *Pleurage anserina*. Mycologia (N.Y.) **26**, 392—414 (1934). — CROWE, L. K.: Incompatibility in *Cosmos bipinatus*. Heredity (Lond.) **8**, 1—11 (1954a). — S Gene structure revealed by the cytoplasm. Heredity (Lond.) **8**, 434 (1954b). — DODGE, B. O.: Spermatia and nuclear migration in *Pleurage anserina*. Mycologia (N.Y.) **28**, 284—291 (1936a). — Facultative and obligate Heterothallism in Ascomycetes. Mycologia (N.Y.) **28**, 399—409 (1936b). — DOWDING, E. S.: The sexuality of the normal, giant and dwarf spores of *Pleurage anserina* (CES.). KUNTZE. Ann. of Bot. **45**, 1—14 (1931). — ERNST, A.: Die Relation Antherenstellung Pollenkorngroße bei Blütendimorphismus und das Kompatibilitätsproblem. Planta (Berl.) **42**, 81—128 (1953). — Untersuchungen zur Phänanalyse, zum Fertilitätsproblem und zur Genetik heterostyler Primeln. Arch. Klaus-Stiftg **30**, 15—137 (1955). — ESSER, K.: Genetische Untersuchungen an *Podospira anserina* (CES.) REHM. Ber. dtsh. bot. Ges. **68**, 143—144 (1955). — GERSTEL, D. U., and M. E. RINER: Self-incompatibility studies in *Guayale* (*Parthenium argentatum*). J. Hered. **41**, 49—55 (1950). — HARTMANN, M.: Die Sexualität. Jena 1943. — HUGHES, M. B., and E. B. BABCOCK: Self-incompatibility in *Crepis foetida*. Genetics (N.Y.) **35**, 570—588 (1950). — KNAPP, E.: Crossing-over and Chromosomenreduktion. Z. Vererbungslehre **73**, 409—418 (1937). — KNIEP, H.: Vererbungserscheinungen bei Pilzen. Bibl. Genet. **5**, 371—475 (1929). — LEWIS, D.: Incompatibility, its genetical and physiological synthesis. Nature (Lond.) **153**, 575 (1944). — Incompatibility in flowering plants. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **24**, 472 bis 496 (1949). — LEWIS, D., and L. K. CROWE: Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutations in *Prunus*. Heredity (Lond.) **8**, 357—363 (1954). — LUDWIG, W.: Über die Häufigkeit von Prä- und Postreduktion. (Grundsätzliches zur Tetradenanalyse). Z. Vererbungslehre **73**, 332—346 (1937). — MICHAELIS, P.: Cytoplasmic inheritance in *Epilobium* and its theoretical significance. Adv. Genet. **6**, 288—402 (1954). — MONNOT, F.: Sur la possibilité de réaliser des croisements réciproques chez l'ascomycete *Podospira anserina*. C. r. Acad. Sci. (Paris) **236**, 2263—2264 (1953). — MOREAU, M., et Mme MOREAU: Observations cytologiques sur les Ascomycetes du genre *Pleurage* FR. Revue Mycol. **16**, 198—208 (1953). — OEHLKERS, F.: Neue Überlegungen zum Problem der außerkaryotischen Vererbung. Z. Vererbungslehre **84**, 213—250 (1952). — PAPAZIAN, H. P.: Physiology and incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. Bot. Gaz. **112**, 143—163 (1950). — The incompatibility factors and a related gene in *Schizophyllum commune*. Genetics **36**, 441—459 (1951). —

QUINTANILHA, A., et J. PINTO-LOPES: Aperçu sur l'état des nos connaissances concernant la «conduite sexuelle» des especes d'Hymenomycetes. Bol. Soc. Brot. **24**, 115—220 (1950). — RIZET, G.: Sur l'analyse génétique des asques du *Podospora anserina*. C. r. Acad. Sci. Paris **212**, 59—61 (1941a). — La ségrégation des sexes et de quelques caractères somatiques chez *Podospora anserina*. C. r. Acad. Sci. Paris **213**, 42—45 (1941b). — La valeur génétique des périthèces nés sur des souches polycaryotiques chez *Podospora anserina*. Bull. Soc. bot. France **88**, 517—520 (1941c). — Thèse Sciences. Paris 1943. — Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I. Analyse génétique des barrages entre souches *S* et *s*. Rev. Cytol. et Biol. végét. **13**, 51—91. — Sur la multiplicité des mécanismes génétiques conduisant a des barrages chez *Podospora anserina*. C. r. Acad. Sci. Paris **237**, 666—668 (1953). — RIZET, G., et C. ENGELMANN: Contribution a la étude génétique d'un Ascomycete tétrasporé: *Podospora anserina* (CES.) REHM. Rev. Cytol. et Biol. végét. **11**, 202—304 (1949). — RIZET, G., et K. ESSER: Sur des phénomènes d'incompatibilité entre souches d'origines différentes chez *Podospora anserina*. C. r. Acad. Sci. Paris **237**, 760—761 (1953). — RYAN, F. J.: Crossing-over and second division segregation in Fungi. Bull. Torrey Bot. Club **70**, 605—611 (1943). — TATUM, E. L., and D. D. PERKINS: Genetics of Microorganisms. Annual Rev. Microbiol. **4**, 129—150 (1950). — WHITEHOUSE, H. L. K.: Heterothallism in Fungi. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **24**, 411—447 (1949a). — Multiple allelomorph heterothallism in the Fungi. New Phytologist **48**, 212—242 (1949b). — ZICKLER, H.: Genetische Untersuchungen an einem heterothallischen Ascomyceten: *Bombardia lunata* nov. spec. Planta (Berl.) **22**, 573—612 (1934). — Zur Entwicklungsgeschichte des Ascomyceten *Bombardia lunata* ZICKL. Arch. Protistenkunde **98**, 1—70 (1952).

Dr. KARL ESSER, Botanisches Institut der Universität, Köln-Lindenthal,
Gyrhofstraße 17

Kurze Mitteilung

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

FERTILITÄT IM HETEROCARYON AUS ZWEI STERILEN MUTANTEN VON *SORDARIA MACROSPORA* AUERSW.

Von

KARL ESSER und JOSEPH STRAUB

(Eingegangen am 4. Mai 1956)

Sordaria macrospora ist ein homothallischer, selbstfertiler Ascomycet. Aus einer Ascospore entsteht ein Mycel, das nach etwa 7 Tagen reife Perithezien trägt. Nach Röntgenbestrahlungen wurden 11 Mutanten mit gestörter Fertilität aufgefunden. Eine vollkommen sterile Mutante, die zwar Protoperithezien, aber keine Fruchtkörper ausbildet, erfuhr eine genetische Analyse. Man kann sie mit dem Wildstamm kreuzen. Die Analyse von 822 Asci ergab, daß sich der Wildstamm und die Mutante in 2 Genen unterscheiden. Als Bezeichnung wählten wir für diese Gene im Wildstamm s und i ($= si$); die sterile Mutante ist entsprechend durch s_1 und i_1 ($= s_1 i_1$) charakterisiert. Die beiden Gene sind nicht gekoppelt. s/s_1 besitzt die Postreduktionsfrequenz $72,8 \pm 3,98$; i/i_1 $60,8 \pm 7,65$.

In der F_1 von $si \times s_1 i_1$ erhält man neben den Elterntypen auch die Rekombinationstypen $s_1 i$ und $s i_1$. Beide sind steril. Sie lassen sich jedoch deutlich unterscheiden. $s_1 i$ bildet Perithezien mit sporenlosen Asci aus. Die entwicklungsgeschichtliche Untersuchung ergab, daß s_1 die Entwicklung der Ascosporen in den Perithezien blockiert. Der andere Rekombinationstyp $s i_1$ läßt nur Protoperithezien entstehen, die nicht zu Fruchtkörpern reifen. Das $s_1 i_1$ -Mycel ist bräunlich gefärbt und dadurch leicht vom Elter $s_1 i_1$ zu unterscheiden. Das Gen i_1 unterbricht also den Sexualzyklus von $s i_1$ schon vor der Perithezienbildung. Es läßt sich zur Zeit noch nicht aussagen, ob die Protoperithezien von $s i_1$ befruchtet werden oder nicht.

Die beiden sterilen Stämme $s_1 i$ und $s i_1$ sind kreuzbar. An der Berührungslinie entstehen neben leeren $s_1 i$ -Perithezien 3 Arten von Perithezien mit reifen Sporen:

1. Solche, die aus einer Kreuzung von $s_1 i \times s i_1$ zu erwarten sind. In diesen Kreuzungsperithezien finden sich Asci, deren Sporen normal in Elterntyp, Rekombinationstyp und Tetratyp aufspalten; 2. solche, die nur $s i_1$ -Sporen enthalten (= Selbstungsperithezien); 3. solche, die Asci vom Typ 1 und 2 nebeneinander enthalten (= Mischperithezien).

Der Grund für dieses merkwürdige genetische Verhalten konnte durch Analyse von 200 Einzelhyphen aus der Berührungszone von $s i_1$ und $s_1 i$ gefunden werden. Diese wachsen alle zu Myzelien aus, die phänotypisch dem Wildstamm gleichen und neben leeren Perithezien ($= s_1 i$) die beschriebenen 3 Peritheziensorten entwickeln. Daraus kann man schließen, daß sich an der Berührungszone ein Heterocaryon $s_1 i/s i_1$ gebildet hat. In ihm sind die s_1 - und i_1 -Defekte durch die Wirkung der Wildgene kompensiert. So kommen normale Kreuzungsasci zustande, wenn

s_1i -Kerne von si_1 -Kernen befruchtet werden. Nach der Befruchtung von s_1i - mit si_1 -Kernen ist offenbar keine Kompensation möglich. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Wirkung der s_1 -Gene auf die Asci begrenzt ist, in denen kein s -Wildallel existiert. Dagegen führen $si_1 \times si_1$ Befruchtungen zu Selbstungsasci mit reifen Sporen, da die i_1 -Wirkung durch i -Kerne des umliegenden Mycelis offensichtlich aufgehoben werden kann. Die i -Wirkung bei der Bildung von $si_1 \times si_1$ Asci wird zur Zeit noch zu analysieren versucht.

Die Fruchtkörperbildung zwischen zwei sterilen Stämmen von *Sordaria macrospora* beruht also auf der Kompensierbarkeit von genbedingten Defekten durch die Wirkungen der entsprechenden Wildgene im Heterocaryon. Sie hat nichts mit relativer Sexualität zu tun, wie sie GREIS (1941) für *Sordaria fimicola* beschreibt. Die Fähigkeit zur Kompensation besitzen nur die Wildgene; denn auch in maximal supplementierten Nährmedien bleiben die Sterilitätserscheinungen der untersuchten Stämme erhalten. Auf den Zusammenhang dieser Befunde mit ähnlichen Versuchsergebnissen an *Glomerella cingulata* (zusammenfassende Darstellung bei WHEELER 1954) soll bei der ausführlichen Darstellung unserer Untersuchungen eingegangen werden.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

GREIS, H.: Mutations- und Isolationsversuche zur Beeinflussung des Geschlechts von *Sordaria fimicola* (Rob.). Z. Bot. **37**, 1—116 (1941). — WHEELER, H. E.: Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. Phytopathology **44**, 342—345 (1954).

Dr. KARL ESSER, Botanisches Institut der Universität, Köln-Lindenthal,
Gyrhofstraße 17

Band 87

Inhalt

4. Heft

Seite

LÜCK, H. B., Untersuchungen über die Blattentwicklung an laciniaten und asplenifoliaten dikotylen Gehölzen. Mit 16 Textabbildungen	497
HADORN, E., und I. SCHWINCK, Fehlen von Isoxanthopterin und Nicht-Autonomie in der Bildung der roten Augenpigmente bei einer Mutante (<i>rosy</i> ²) von <i>Drosophila melanogaster</i> . Mit 4 Textabbildungen	528
FOX, A. S., Paper chromatographic studies of the effects of the <i>Lozenge</i> pseudoalleles on free amino acids and peptides in <i>Drosophila melanogaster</i> . With 5 figures in the text	554
ANDERS, F., Über Ausbildung und Vererbung der Körperfarbe bei <i>Gammarus pulex</i> ssp. <i>subterraneus</i> (SCHNEIDER), einer normalerweise pigmentlosen Höhlenform des gemeinen Bachflohkrebses	567
KÜHN, A., Der Faktor <i>ml</i> (musterlos) in Kombination mit anderen mutierten Faktoren von <i>Ephestia kühniella</i> . Mit 4 Textabbildungen	580
OEHLKERS, F., Die Auslösung von Mutationen durch Chemikalien bei <i>Antirrhinum majus</i>	584
BRESCH, C., und TH. TRAUTNER, Die Bedeutung des Zweifarbnährbodens für genetische Untersuchungen am Bakteriophagen T 1. Mit 6 Textabbildungen, davon 5 farbigen Teilfiguren	590
ESSER, K., Die Inkompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von <i>Podospira anserina</i> (CES.) REHM. I. Die genetische Analyse der Semi-Inkompatibilität. Mit 12 Textabbildungen	595
ESSER, K., und J. STRAUB, Kurze Mitteilung. Fertilität im Heterocaryon aus zwei sterilen Mutanten von <i>Sordaria macrospora</i> AUERSW.	625

Aufnahmebedingungen

Der Inhalt der Arbeit soll dem Gebiet der allgemeinen oder speziellen Genetik, der Cytogenetik, der Grenzfragen der Entwicklungsphysiologie und Genetik, der biophysikalischen Grundlagen der Genetik oder der experimentellen Evolutionsforschung angehören. Arbeiten aus den angewandten Gebieten der Tier- und Pflanzenzüchtung oder der Humangenetik werden nur aufgenommen, wenn die Ergebnisse auch für die Grundlagenforschung wichtig sind.

Die eingereichten Manuskripte müssen völlig druckfertig sein. Der Verlag übernimmt Korrekturkosten nur bis zur Höhe von 10% der Satzkosten. Die Manuskripte sind so kurz und übersichtlich wie möglich zu fassen. Außer der deutschen Sprache kann auch eine der anderen drei Kongreßsprachen verwendet werden.

Die für Petitsatz vorgesehenen Manuskriptteile sind am Rande mit einem senkrechten Strich und Hinzufügung des Buchstabens p zu kennzeichnen.

Autorennamen sind im Manuskript mit großen Buchstaben zu schreiben oder doppelt zu unterstreichen.

Lateinische Tier- und Pflanzennamen, Gensymbole und mathematische Formeln sollen *kursiv* gedruckt werden und sind im Manuskript gewellt zu unterstreichen, ebenso weitere Hervorhebungen im laufenden Text. Gesperrter Druck wird nicht ausgeführt.

Literaturhinweise sind im Text durch den Namen des Autors mit der Jahreszahl der Veröffentlichung, z. B. Sax 1947, anzuführen; am Schluß der Arbeit ist ein nach Autorennamen alphabetisch geordnetes Literaturverzeichnis zu geben, welches Titel der Arbeit, Titel der Zeitschrift, Bandzahl, Seitenzahl und Jahreszahl enthält; z. B. Sax, K.: Temperature effects on X-ray induced chromosome aberrations. Genetics 32, 75 (1947).

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, zu bevorzugen sind durch Strichätzung reproduzierbare Figuren. Diagramme sind als Bleistiftzeichnungen einzureichen. Abbildungsbeschriftungen sind ebenfalls nur mit Bleistift anzugeben. Die Abbildungen sind getrennt vom Text auf besonderem Bogen einzureichen. Die Abbildungsunterschriften gehören dagegen zum Text und sind dem Manuskript beizugeben.

Protozoologie

Von Karl G. Grell, apl. Professor für Zoologie und wissenschaftliches Mitglied am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen. Mit 300 Abbildungen. VIII, 284 Seiten Gr-8°. 1956. Ganzleinen DM 59.—

Inhaltsübersicht: Einleitung. — Abgrenzung und Begriff. — Morphologie. Das Cytoplasma. Die Zellmembran. Der Zellkern. — Fortpflanzung. Äquale Zellteilung. Inäquale Zellteilung. Reorganisation. — Befruchtung und Geschlechtlichkeit. Gametogamie. Gamontogamie. Parthenogenese. — Generationswechsel. — Modifikabilität. — Vererbung. Kreuzungsversuche. Mutationen. Langdauernde Veränderungen in Klonen. — Bewegung. Ortsveränderung. Gestaltveränderung. — Verhalten. — Ernährung. — Parasitismus und Symbiose. — Formenübersicht: I. Klasse: Flagellata. 1. Ordnung: Chrysomonadina. 2. Ordnung: Cryptomonadina. 3. Ordnung: Phytomonadina. 4. Ordnung: Euglenoidina. 5. Ordnung: Dinoflagellata. 6. Ordnung: Protomonadina. 7. Ordnung: Diplomonadina. 8. Ordnung: Polymastigina. 9. Ordnung: Opalinida. II. Klasse: Rhizopoda. 1. Ordnung: Amoebina. 2. Ordnung: Testacea. 3. Ordnung: Heliozoa. 4. Ordnung: Radiolaria. 5. Ordnung: Foraminifera. III. Klasse: Sporozoa. 1. Ordnung: Gregarinida. 2. Ordnung: Coccidia. IV. Klasse: Ciliata. 1. Unterklasse: Euciliata. 1. Ordnung: Holotricha. 2. Ordnung: Spirotricha. 3. Ordnung: Peritricha. 4. Ordnung: Chonotricha. 2. Unterklasse: Suctoria. — Veröffentlichungen: Zusammenfassende Darstellungen. Einzelarbeiten und Werke aus Nachbargebieten. Filme. — Sachverzeichnis. — Artenverzeichnis.

Die Protozoologie ist keine besondere Wissenschaft, sondern nur die Zusammenfassung der Kenntnisse, welche wir von einer bestimmten Tiergruppe, den Protozoen, besitzen. Sie ist daher nichts weiter als ein Teil der speziellen Zoologie. Trotzdem hat das Wort „Protozoologie“ einen besonderen Klang. Mehr als alle anderen Tiergruppen haben die Protozoen dazu angeregt, Fragen von allgemeiner biologischer Bedeutung aufzuwerfen, und nicht wenige Fragen sind mit ihrer Hilfe beantwortet worden oder einer Beantwortung näher gerückt.

In anderen Ländern ist die Bewertung der Protozoen als Untersuchungsobjekte in ständigem Anstieg begriffen. Äußerlich kommt dies z.B. darin zum Ausdruck, daß die im Jahre 1947 in den USA gegründete „Society of Protozoologists“ heute bereits über 450 Mitglieder zählt. Seltsamerweise ist aber das Interesse an den Protozoen unter den deutschen Biologen immer mehr im Schwinden begriffen. Mit diesem Buch möchte der Verfasser dazu beitragen, dieses Interesse neu zu beleben. In einer Zeit, in welcher die Biologie das Lebensproblem von den verschiedensten Seiten in Angriff nimmt, scheint ihm die Bedeutung der Protozoen vor allem darin zu bestehen, daß sie dem Forscher die Möglichkeit geben, eine einzelne Zelle in ihrer Differenzierung, Fortpflanzung und Vererbung unmittelbar zu studieren. Indem er die Mannigfaltigkeit der Erscheinungsformen vor dem Leser ausbreitet, ist der Verfasser bestrebt, ihn überall bis zu den aktuellen Fragen der Lebensforschung, soweit die Protozoen zu ihrer Lösung beigetragen haben, hinzuführen.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG